

# Bimetallische Silber-Gold-Nanopartikel - Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Untersuchungen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Simon Ristig**

geboren in Oldenburg(Oldb)

Fakultät für Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

**2014**



*The most exciting phrase to hear in science,  
the one that heralds new discoveries,  
is not 'Eureka!'  
but 'That's funny...'*

Isaac Asimov





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2011 bis Juni 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Epple an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Epple

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Sand

Tag der Disputation: 18.11.2014



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Ziel der Arbeit.....	3
3. Theoretischer Hintergrund.....	4
3.1 Kolloidale Systeme und Nanopartikel .....	4
3.2 Stabilität von Kolloiden.....	6
3.3 Edelmetallnanopartikel.....	12
3.3.1 Goldnanopartikel .....	12
3.3.2 Silbernanopartikel .....	17
3.3.3 Silber-Gold-Nanopartikel.....	19
3.4 Optische Eigenschaften von Silber- und Goldnanopartikeln .....	22
4. Ergebnisse und Diskussion .....	26
4.1 Bimetallische Silber-Gold Nanopartikel.....	26
4.1.1 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit Trinatriumcitrat.....	28
4.1.2 Umfunktionalisierung mit PVP.....	40
4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von Ag-Au-Nanopartikeln mit Citrat und der folgenden Umfunktionalisierung mit PVP .....	50
4.2.1 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit einem Gemisch aus tri-Natriumcitrat und Tannin .....	51
4.2.2 Umfunktionalisierung mit PVP und TPPTS .....	62
4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von Ag-Au-Nanopartikeln mit Citrat und Tannin sowie deren Umfunktionalisierung mit PVP und TPPTS .....	85
4.3.1 Einfluss der Konzentration des Reduktionsmittelgemisches (Citrat/Tannin) auf die resultierende Partikelgröße .....	86
4.3.2 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit 1,5-facher Konzentration an Trinatriumcitrat und Tannin .....	90

4.3.2.1 Untersuchung der Struktur der Ag:Au-PVP-Nanopartikel mittels Röntgenpulverdiffraktometrie .....	99
4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen des Einflusses der Reduktionsmittelkonzentrationen und der Charakterisierung von 7 nm-großen Ag:Au-PVP-Nanopartikeln .....	106
4.4 Zellbiologische Untersuchungen mit bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln .....	107
4.4.1 Stabilität von Ag:Au-PVP und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln in zellbiologischem Medium .....	108
4.4.2 Zelltoxizität von PVP- und TPPTS-funktionalisierten 11 nm-großen Ag:Au-50:50-Nanopartikeln gegenüber hMSCs .....	109
4.4.3 Zelltoxizität von PVP-funktionalisierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber HeLa-Zellen .....	113
4.4.4 Zelltoxizität von PVP-funktionalisierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber hMSCs .....	116
4.4.5 Zusammenfassung der zellbiologischen Untersuchungen von Ag:Au-PVP- und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat und Tannin .....	119
4.5 Ultrakleine bimetallic Silber-Gold Nanopartikel .....	120
4.5.1 Stabilisierung mit 11-Mercaptoundecansäure .....	121
4.5.2 Stabilisierung mit Dihydroliponsäure .....	137
4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln .....	144
4.6 Zellbiologische Untersuchungen mit ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln .....	146
4.6.1 Zelltoxizität von 11-MUA-funktionalisierten ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber HeLa-Zellen .....	147
4.6.2 Aufnahme von 11-MUA-funktionalisierten ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln in HeLa-Zellen .....	149

4.6.3 Zusammenfassung der zellbiologischen Untersuchungen von Ag:Au-11-MUA-Nanopartikeln .....	155
5. Zusammenfassung.....	155
6. Experimenteller Teil .....	158
6.1 Analytik .....	158
6.1.1 Mikroskopische Methoden .....	158
6.1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	158
6.1.1.1.1 Theoretischer Hintergrund .....	158
6.1.1.1.2 HR-TEM, STEM, EDX und HAADF .....	159
6.1.1.1.3 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	160
6.1.1.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	161
6.1.1.2.1 Theoretischer Hintergrund .....	161
6.1.1.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	162
6.1.1.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) .....	163
6.1.1.3.1 Theoretischer Hintergrund .....	163
6.1.1.3.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	164
6.1.2 Spektroskopische Methoden.....	165
6.1.2.1 UV-Vis-Spektroskopie.....	165
6.1.2.1.1 Theoretischer Hintergrund .....	165
6.1.2.1.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	166
6.1.2.2 Fluoreszenzspektroskopie .....	167
6.1.2.2.1 Theoretischer Hintergrund .....	167
6.1.2.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	169
6.1.2.3 Infrarotspektroskopie .....	169
6.1.2.3.1 Theoretischer Hintergrund .....	169
6.1.2.3 Verwendetes Gerät und Spezifikationen.....	172
6.1.2.4 NMR-Spektroskopie.....	172

6.1.2.4.1 Theoretischer Hintergrund.....	172
6.1.2.4.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen .....	175
6.1.2.5 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS).....	175
6.1.2.5.1 Theoretischer Hintergrund.....	175
6.1.2.5.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen .....	176
6.1.3 Weitere Methoden.....	176
6.1.3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	176
6.1.3.1.1 Theoretischer Hintergrund.....	176
6.1.3.1.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen .....	179
6.1.3.2 Differentielle zentrifugale Sedimentation (DCS) .....	179
6.1.3.2.1 Theoretische Grundlagen.....	179
6.1.3.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen .....	181
6.1.3.3 Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD).....	181
6.1.3.3.1 Theoretischer Hintergrund.....	181
6.1.3.3.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen .....	185
6.2 Verwendete Chemikalien .....	186
6.3 Synthesen .....	187
6.3.1 Synthese durch Reduktion mit Citrat oder Citrat/Gerbsäure .....	187
6.3.1.1 Au- und Ag-Nanopartikel.....	187
6.3.1.2 Ag-Au-Nanopartikel.....	187
6.3.1.3 Umfunktionalisierung der Nanopartikel .....	189
6.3.2 Synthese durch Reduktion mit Natriumborhydrid .....	189
6.3.2.1 Au-Nanopartikel .....	189
6.3.2.2 Ag-Nanopartikel .....	190
6.3.2.3 Ag-Au-Nanopartikel.....	190
6.4 Zellbiologische Untersuchungen .....	191

6.4.1 Zytotoxizität von Ag:Ag-50:50-PVP- und Ag:Ag-50:50-TPPTS-Nanopartikeln und Freisetzung von IL-6 und IL-8 .....	191
6.4.2 Zytotoxizität von 7 nm Ag:Ag-PVP-Nanopartikeln .....	192
6.4.2. Zytotoxizität von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln .....	193
6.4.3. Aufnahmestudie von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln .....	194
7. Literaturverzeichnis .....	195
8. Anhang .....	209
Abkürzungsverzeichnis .....	209
Publikationsliste .....	211
Publikationen in wissenschaftlich referierten Fachzeitschriften .....	211
Wissenschaftliche Posterbeiträge auf Fachtagungen .....	211
Eidesstattliche Erklärung .....	214
Lebenslauf .....	215
Danksagung .....	216





## 1. Einleitung

Nanowissenschaften und Nanotechnologien haben in den vergangenen Jahrzehnten ein stark anwachsendes Interesse in vielen naturwissenschaftlichen Disziplinen, aber auch in Wirtschaft und Politik erfahren, da in ihnen ein großes Potential für die Entwicklung wegweisender Anwendungen und Technologien gesehen wird. Es existieren in der heutigen Zeit schon viele kommerziell erhältliche Produkte, die auf nanotechnologischen Entwicklungen basieren. Darunter fallen z.B. elektronische und technische Bauteile, die mit ultradünnen Beschichtungen versehen sind oder nanostrukturierte Oberflächen aufweisen und in Informations- und Kommunikationstechnik, Automobilindustrie und Luftfahrttechnik eingesetzt werden.<sup>[1]</sup> Auch im Bereich der Mikro- und Nanoelektronik wurden große Fortschritte erzielt. So wurde etwa innerhalb von nur 14 Jahren die Fertigungstechnik für Prozessorkerne von 250 nm (1998) auf 22 nm (2012) verringert. Heutzutage wird im Bereich der Nano- und Optoelektronik intensiv an Alternativen zu klassischen Halbleitermaterialien geforscht, um noch leistungsfähigere Prozessoren, Chipsätze und Datenleitungen zu realisieren. Dabei stehen unter anderem Kohlenstoffnanoröhrchen (*SWCNTs – single wall carbon nanotubes*) und photonische Kristalle im Zentrum der Forschung.<sup>[2]</sup> Neben Materialien mit nanostrukturierten Oberflächen sind mittlerweile auch Endverbraucherprodukte, die Nanopartikel enthalten, standardmäßig zu erwerben. So sind z.B. in Sonnencremes Titandioxid- oder Zinkoxid-Nanopartikel<sup>[3]</sup> enthalten, Silbernanopartikel finden in Deodorants und auf medizinischen Implantaten Verwendung.<sup>[4–6]</sup> Neben Silbernanopartikeln werden auch funktionalisierte Kohlenstoff-Nanoröhrchen, metallische und nichtmetallische Titan-Nanokomposite, sowie Zinkoxid-, Kupfer- und Galliumnanopartikel zur antibakteriellen Modifizierung von z.B. Funktionswäsche untersucht.<sup>[7]</sup> Die Analyse antibakterieller Eigenschaften von Nanopartikeln ist ein wichtiger Aspekt der aktuellen biomedizinischen und biologischen Forschung. Weitere (potentielle) Anwendungsgebiete für Nanopartikel im klinischen oder biomedizinischen Bereich bestehen in Diagnose und Therapie.<sup>[8]</sup> Eine therapeutische Anwendung von Nanopartikeln, z.B. zum gezielten Ansteuern

bestimmter Zelltypen oder Organe in Gen-<sup>[9]</sup> oder Tumorthherapie<sup>[10]</sup> bzw. als Wirkstoffträger,<sup>[11,12]</sup> wurde auf Grund der schwer abschätzbaren Risiken einer *in vivo* Applikation am Menschen noch nicht zugelassen. In der Diagnostik hingegen werden Nanopartikel bereits regelmäßig eingesetzt.<sup>[8,11,13]</sup> Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel aus Magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) oder Maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) werden auf Grund ihrer guten Biokompatibilität als Kontrastmittel im MRT verwendet.<sup>[14]</sup> Ein wichtiges Gebiet der Diagnostik ist die *in-vitro* Untersuchung von Zellen. Dabei werden funktionalisierte oder fluoreszierende Nanopartikel zur Detektion und Markierung von Proteinen, zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen oder Zellkompartimenten und für Aufnahmestudien verwendet.<sup>[15,16,17]</sup> In Aufnahmestudien und zur Bildgebung in Zellen kommen neben Quantenpunkten in den letzten Jahren auch vermehrt ultrakleine autofluoreszierende Gold- oder Silbernanopartikel zum Einsatz.<sup>[18,19,20]</sup> Trotz des großen Erfolges und vielen vielversprechenden Ansätzen der Nanotechnologie dürfen jedoch die potentiellen Risiken einer Exposition von Organismen gegenüber Nanopartikeln nicht außer Acht gelassen werden. Daher ist bei der Beschreibung eines neuen Nanopartikelsystems im Zuge der ausgiebigen Charakterisierung zumindest eine zellbiologische Untersuchung hinsichtlich potentieller Toxizität als sinnvoll zu erachten.

## **2. Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung einer nasschemischen Synthese von bimetallicen Nanopartikeln aus Silber und Gold angestrebt. Dabei lag der Fokus auf einer Synthese in wässrigem Medium mit möglichst geringer Anzahl an Reaktanden und Gewährleistung einer geeigneten Aufreinigungsmethode der dargestellten Nanopartikel. Die Partikel sollten in möglichst vielen verschiedenen Zusammensetzungen synthetisiert werden. Weitere Aspekte sollten die Variabilität der Syntheseroute hinsichtlich Größenkontrolle und Monodispersität der Nanopartikel sowie ein möglicher Ligandenaustausch darstellen. Die aufgereinigten bimetallicen Silber-Gold Nanopartikel sollten umfassend charakterisiert und in zellbiologischen Experimenten hinsichtlich ihrer Zytotoxizität in Abhängigkeit von Partikelgröße, Ligand und Silbergehalt untersucht werden.

Nach analogen Kriterien sollten ultrakleine bimetalliche Silber/Gold Nanopartikel hergestellt werden. Diese Cluster-ähnlichen Nanopartikel im Größenbereich zwischen 1 und 3 nm sollten in Anlehnung an literaturbekannte Arbeiten zu Gold-Clustern synthetisiert werden und nach Möglichkeit autofluoreszente Eigenschaften aufweisen. Da ultrakleine bimetalliche Silber/Gold Nanopartikel noch eine relativ junge Partikelspezies darstellen, lag das Hauptaugenmerk auf der Charakterisierung dieser Partikel. Effektive Aufreinigungsmethoden sollten gefunden werden, um anschließende zellbiologische Untersuchungen durchführen zu können.

## 3. Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Kolloidale Systeme und Nanopartikel

Als Kolloide oder kolloiddisperse Systeme werden fein verteilte Moleküle oder Partikel in einem kontinuierlichen Medium bezeichnet. Damit liegen Kolloide auf physikalisch-chemischer Ebene zwischen den molekularen Dimensionen echter Lösungen und makroskopischen Dimensionen von heterogenen Mischungen.<sup>[21]</sup> Die Grundsteine der Kolloidwissenschaften wurden schon 1845 von *Francesco Selmi* gelegt, der Aggregationsstudien von Pseudolösungen aus Silberiodid und Schwefel in Wasser durchführte.<sup>[22]</sup> Im Jahr 1857 berichtete *Faraday* erstmals von kolloiddispersen Goldpartikeln.<sup>[23]</sup> Die Bezeichnung Kolloid geht jedoch auf *Graham* zurück, der 1861 solche Spezies als Kolloid definierte, die nicht durch eine feine Membran diffundieren konnten.<sup>[24]</sup> Daraus ergab sich die Partikelgröße als ein wichtiges Kriterium für kolloidale Systeme. Aktuelle Definitionen von Kolloiden beschreiben die Größenordnung der Teilchen in der dispergierten Phase im Bereich von 1 nm - 1 µm oder von 1 nm - 500 nm.<sup>[25]</sup> Nach *Staudinger* können kolloidale Systeme auf Grund ihrer thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt werden.<sup>[21]</sup> Die Dispersionskolloide sind zweiphasige Systeme aus dispergierten lyophoben Partikeln in einem kontinuierlichen Dispersionsmedium. Dispersionskolloide sind thermodynamisch instabil, neigen daher zu Aggregation oder Auflösung und müssen demnach häufig sterisch oder elektrostatisch stabilisiert werden. Molekülkolloide sind thermodynamisch stabile Systeme aus lyophilen Makromolekülen, z.B. Polymeren. Die Partikelgröße wird stark durch den Polymerisationsgrad und die Tertiärstruktur der Makromoleküle beeinflusst. Die dritte Klasse kolloidaler Systeme sind die Assoziationskolloide. Dies sind thermodynamisch stabile lyophile Systeme aus kolloidalen Mizellen, die beim Erreichen der kritischen Mizellbildungskonzentration spontan und reversibel aus Tensidmolekülen entstehen.<sup>[21]</sup> In zweiphasigen Systemen können die disperse Phase und das Dispersionsmedium in verschiedenen Kombinationen der Aggregatzustände vorliegen. Die Bezeichnungen dieser unterschiedlichen Systeme sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Unterschiedliche kolloidale Systeme.**

<b>Dispersionsmedium</b>	<b>Disperse Phase</b>	<b>Bezeichnung</b>
Gas	Flüssigkeit	<b>Flüssigaerosol, Nebel</b>
Gas	Feststoff	<b>Festaerosol, Rauch</b>
Flüssigkeit	Gas	<b>Schaum</b>
Flüssigkeit	Flüssigkeit	<b>Emulsion</b>
Flüssigkeit	Feststoff	<b>Dispersion, Sol, Suspension</b>
Feststoff	Gas	<b>Festschaum</b>
Feststoff	Flüssigkeit	<b>Festemulsion</b>
Feststoff	Feststoff	<b>Festes Sol, Legierung</b>

Der Begriff Nanopartikel beschreibt typischerweise feste Teilchen mit besonders kleinen Dimensionen und physikalisch-chemischen Eigenschaften, die sich deutlich vom dazugehörigen Bulkmaterial unterscheiden. Die Größe, nach denen Teilchen als Nanopartikel klassifiziert werden, variiert jedoch und es gibt keine allgemeingültige Definition. Oft wird als Kriterium für Nanopartikel eine Größe von 1 - 100 nm in einer Dimension beschrieben. Ultrakleine Partikel, bestehend aus nur wenigen Atomen und mit Größen von nur wenigen Nanometern werden häufig als Cluster oder Nanocluster bezeichnet.<sup>[26,27]</sup> Nach einer Empfehlung der IUPAC wird „Nanopartikel“ als Bezeichnung für Mikropartikel, deren Größe in Nanometern angegeben wird, vor allem aber für nanoskopische Partikel mit aerodynamischem Durchmesser von unter 100 nm verwendet.<sup>[28]</sup> Im Allgemeinen lassen sich Nanopartikeldispersionen den beschriebenen Dispersionskolloiden zuordnen. Die großen Oberflächen/Volumen-Verhältnisse von Nanopartikeln, spezielle physikalisch-chemische Merkmale wie etwa größen- und morphologieabhängige optische Eigenschaften und die Möglichkeit, viele nanopartikuläre Systeme durch Modifikation der Oberfläche zu funktionalisieren, machen Nanopartikel zu einer für viele Forschungs- und Anwendungsgebiete interessanten Spezies.<sup>[16,29]</sup>

#### 3.2 Stabilität von Kolloiden

Kolloidale Teilchen besitzen auf Grund ihrer großen spezifischen Oberfläche prinzipiell nur eine geringe thermodynamische Stabilität und neigen zur Agglomeration. Dies ist auf die im Vergleich zu einem System mit größeren Partikeln erhöhte freie Enthalpie zurückzuführen. Der Zusammenhang der freien Enthalpie eines Systems mit der Oberfläche der kolloidalen Partikel kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$dG = \gamma \cdot dA_G \quad (\text{Gleichung 1})$$

$G$  : Freie Enthalpie

$\gamma$  : Grenzflächen- oder Oberflächenspannung

$A_G$  : Grenzfläche

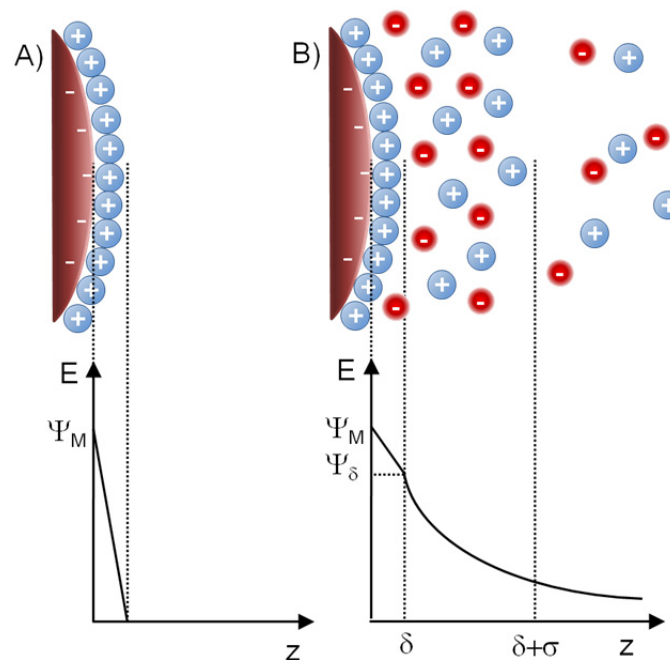
Da bei einer Verringerung der Grenzfläche ( $A_G$ ) die freie Enthalpie  $G$  des Systems abnimmt, ist die Minimierung der Oberfläche, also die Agglomeration, ein freiwillig ablaufender Prozess. Ob ein Kolloid kinetisch stabil ist, hängt unter anderem von den unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln ab. Unter den attraktiven Wechselwirkungen, welche die Aggregation des Kolloids begünstigen, sind die weitreichenden *van-der-Waals*-Kräfte die prominentesten. Des Weiteren können physikalische und chemische Adsorptionskräfte und elektrostatische Anziehungskräfte zwischen unterschiedlich geladenen Partikeln auftreten. Die stärksten repulsiven Wechselwirkungen, welche das Kolloid stabilisieren und einer Ausflockung entgegenwirken, stellen elektrostatische Abstoßungen zwischen gleich geladenen Partikeln dar.<sup>[30]</sup> Daneben können die *Bornsche* Abstoßung, welche die starken repulsiven Wechselwirkungen bei der Durchdringung der Elektronenhüllen mit sehr geringen Abständen beschreibt, und schwache Abstoßungen zwischen Hydrathüllen einen stabilisierenden Effekt ausüben.<sup>[31]</sup>

Auf Grund der beschriebenen thermodynamischen Instabilität unterliegt ein nicht ideal monodisperses kolloidales System, der langsamen Aggregation, der sogenannten Alterung. Der Alterungsprozess führt langfristig zur

Auflösung von kleinen Partikeln zu Gunsten der Bildung von größeren. Im Falle von emulgierten Tröpfchen kann es durch Kollisionen zum Austausch von Material der kolloidalen Phase kommen, wodurch die Tröpfchengröße verändert werden kann. Im Falle von festen Partikeln muss eine begrenzte Löslichkeit der dispersen Phase im kontinuierlichen Medium gegeben sein, damit ein Übergang von Teilchen über Diffusionsprozesse oder Auflösung und anschließende Ablagerung von kleinen zu großen Partikeln stattfinden kann. Dieser Prozess, auch bekannt als *Ostwald-Reifung*, kann durch bestimmte Einflüsse wie etwa eine Erhöhung der Temperatur und damit zunehmende *Brownsche* Molekularbewegung oder dem Zusatz von Elektrolyten beschleunigt werden und führt nach der Koagulation zu einer Sedimentation der größeren Partikel.<sup>[24,29]</sup> Die Koagulation der Partikel kann je nach System und Einflüssen entweder reversibel oder irreversibel sein.<sup>[32]</sup>

Um Koagulation zu unterbinden oder zumindest zu verzögern, gibt es unterschiedliche Stabilisierungsansätze. Die DLVO-Theorie (nach *Derjaguin, Landau, Verwey* und *Overbeek*) beschreibt das Zusammenwirken von repulsiven und attraktiven Wechselwirkungen zwischen geladenen Partikeln.<sup>[33]</sup> Mit ihrer Hilfe lassen sich direkte Abschätzungen über die Stabilität von lyophoben Dispersionen vornehmen. Die in Dispersionskolloiden vorliegenden Teilchen tragen, wenn sie in einem elektrolytischen Medium dispergiert sind, an ihrer Oberfläche zumeist eine elektrische Ladung. Bei ursprünglich neutralen Partikeln wird angenommen, dass die Oberfläche des Festkörpers eine Oberflächenladung ausbildet, sobald diese mit dem Elektrolyten in Kontakt kommt.<sup>[34]</sup> Auf Grund dieser Ladung orientieren sich Ionen aus dem Dispersionsmedium um die Partikel und lagern sich im Zuge einer Ladungskompensation an diese an. Es gibt zwei anschauliche Modelle, die die Ladungsverhältnisse an den Phasengrenzen zwischen Partikel und flüssigem Medium darstellen. Das Modell nach *Helmholtz* beschreibt eine starre Schicht aus solvatisierten Ionen, die eine zur Oberfläche gegensätzliche Ladung tragen. Diese Gegenionen sind direkt auf der Partikeloberfläche adsorbiert und führen keine eigenständigen thermisch induzierten Bewegungen aus (Abbildung 1). Das zweite Modell nach *Stern, Gouy* und *Chapman* (SGC-Modell) beschreibt

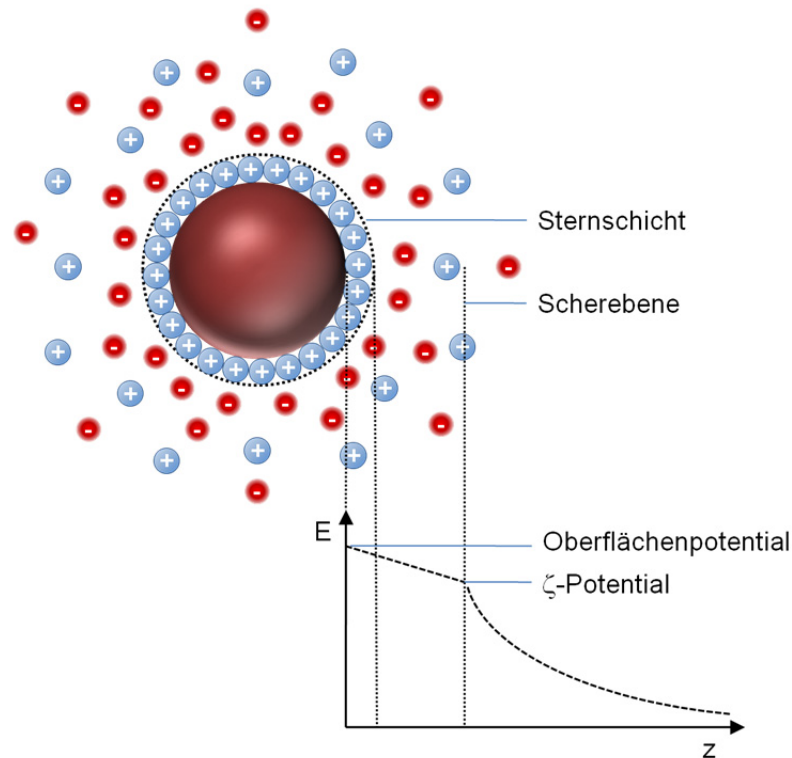
eine Doppelschicht aus direkt an der Partikeloberfläche adsorbierten Gegenionen, sowie einer auf die starre Schicht folgenden, mehrere Moleküllagen weit reichenden diffusen Schicht aus solvatisierten Ionen. Die diffuse Schicht bildet bedingt durch thermische Bewegungen der Ionen und Solvensmoleküle im Dispersionsmedium eine dynamische, ionische Hülle um die Partikel und stellt einen Ladungsausgleich zwischen dem Dispersionsmedium und der starren Schicht her (siehe Abbildung 1).<sup>[24]</sup>



**Abbildung 1: Elektrochemische Doppelschicht im Helmholz-Modell (A) und SGC-Modell (B) mit dazugehörigen Potentialverläufen,  $\Psi_M$  = Galvanispannung / Potentialunterschied,  $\Psi_\delta$  = Sternpotential,  $\delta$  = Dicke der Stern-Schicht,  $\sigma$  = Dicke der diffusen Schicht,  $z$  = Oberflächenabstand.**

Bewegen sich die Partikel durch das Dispersionsmedium, so bewegen sich die Ionen der Stern-Schicht sowie ein Teil der diffusen Schicht. Der Radius der Ionenhülle, die sich mit dem Partikel in der Dispersion bewegt, wird Scherradius genannt. Das Potential an der Grenze zwischen hydrodynamischem Scherradius und Dispersionsmedium wird als Zetapotential bezeichnet (siehe Abbildung 2) und ist ein Maß für die Stabilität von kolloidalen Systemen.<sup>[24,29]</sup> Weisen alle Partikel eines Systems ein einheitlich großes positives oder negatives Zetapotential ( $\pm 30$  mV) auf, so sind repulsive Wechselwirkungen zwischen den Partikeln stark ausgeprägt und eine Agglomeration der Partikel wird erschwert.





**Abbildung 2: Potentialverlauf an der Fest-Flüssig-Phasengrenze.**

Diese Art der repulsiven Wechselwirkung ist elektrostatischer Natur und ein Bestandteil der durch die DLVO-Theorie angestellten Stabilitätsbetrachtungen kolloidaler Systeme. Nach der DLVO-Theorie lässt sich die Stabilität von Kolloiden aus der Gesamtpotentialfunktion  $V_T$  des Systems ableiten:

Gleichung 2

$V_T$  : Gesamtpotential

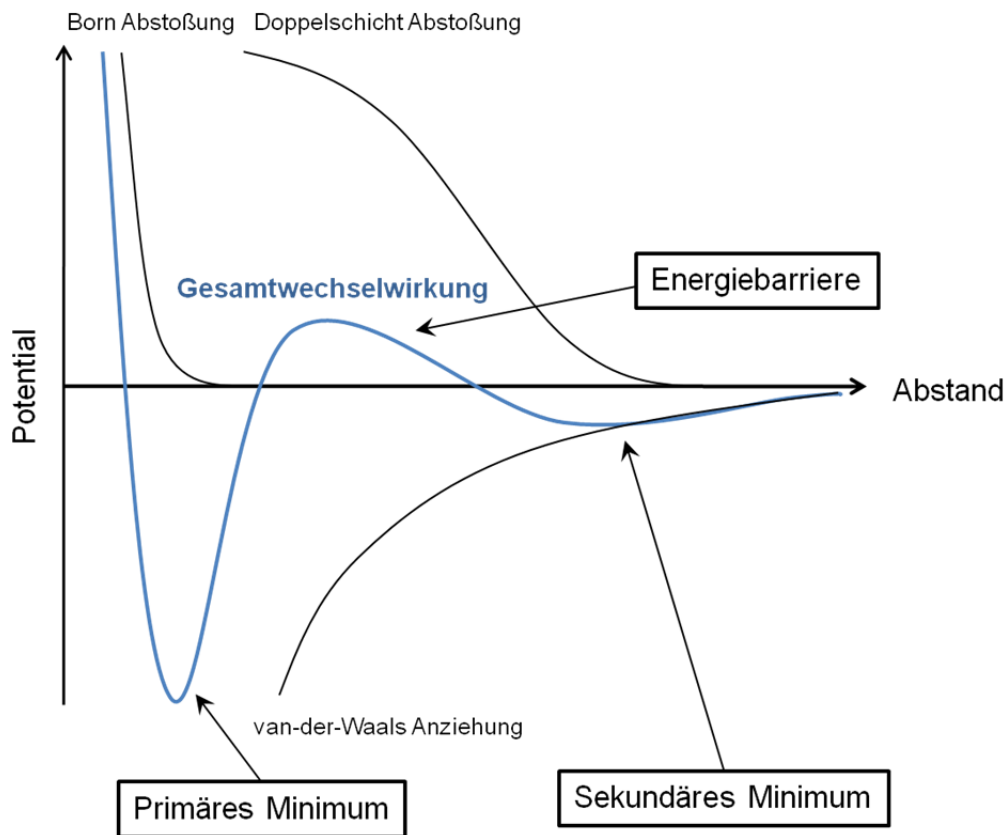
$V_A$  : Potentialbeitrag durch attraktive Wechselwirkungen

$V_R$  : Potentialbeitrag durch repulsive Wechselwirkungen

$V_S$  : Potentialbeitrag durch Dispersionsmedium

Die Einflüsse des Dispersionsmediums sind als gering zu betrachten. Die Aufsummierung der einflussreichen Komponenten, d.h. *van-der-Waals* Anziehung, *Born* Abstoßung und die oben angesprochene Abstoßung durch

die elektrochemische Doppelschicht, ergibt eine Potential-Abstandsfunktion der folgenden Art:

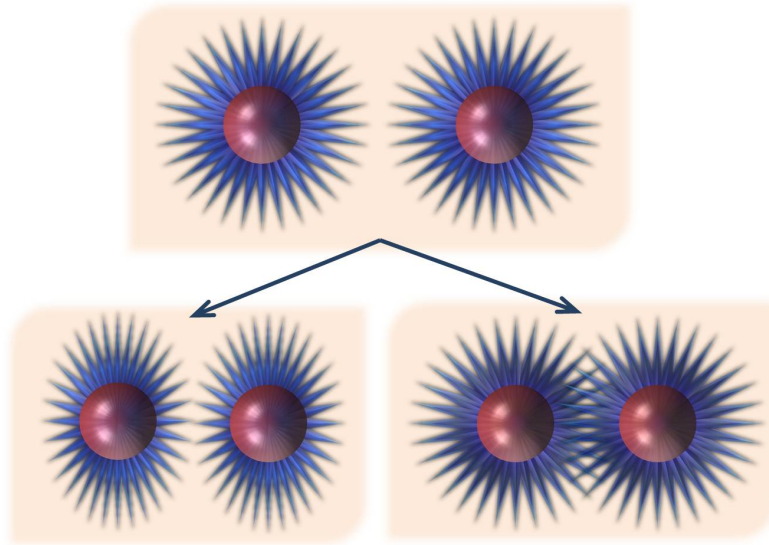


**Abbildung 3: Potential-Abstandsfunktion aus unterschiedlichen Wechselwirkungen.<sup>[1]</sup>**

An Hand des Kurvenverlaufs ist zu sehen, dass die Höhe der gekennzeichneten Energiebarriere, das lokale Maximum der Potentialkurve, entscheidend für die Stabilität des kolloidalen Systems ist. Je höher die Energie dieses Maximums ist, desto stabiler ist die Dispersion.<sup>[21,24]</sup> Bei Partikeln, die sich vom energetischen Standpunkt aus im sekundären Minimum befinden, kann eine reversible Ausflockung auftreten. Wird das Energiemaximum, welches von den repulsiven Wechselwirkungen herrührt, durch zu starke Annäherung der Partikel überschritten, so überwiegen die attraktiven *van-der-Waals*-Kräfte deutlich und die Partikel koagulieren irreversibel. Eine Erhöhung der Ladungsdichte an der Partikeloberfläche führt zu einer Potentialerhöhung der Energiebarriere und begünstigt eine reversible Ausflockung gegenüber der irreversiblen Aggregation.<sup>[35]</sup> Die auf elektrostatischen Wechselwirkungen basierende Stabilität von kolloidalen

Systemen ist jedoch stark abhängig von der Elektrolytkonzentration in der kontinuierlichen Phase. Durch eine erhöhte Salzkonzentration in der Dispersion kann es schnell zu einer Absenkung der elektrostatischen Repulsion, also einer Erniedrigung der kinetischen Potentialbarriere, kommen, was zu einem überwiegend attraktiv wirkenden Gesamtpotential und damit zur Aggregation des Kolloids führt.<sup>[24,36]</sup>

Das Aufbringen einer sterisch anspruchsvollen Ligandenhülle kann besonders in Systemen, in denen elektrostatische Stabilität nicht oder nur unzureichend erzielt werden kann, z.B. in unpolaren Lösungsmitteln oder in Systemen mit erhöhter Elektrolytkonzentration, die Stabilität von kolloidalen Partikeln bedeutend erhöhen. Die Bedeckung der Partikeloberfläche mit sterisch anspruchsvollen Liganden, z.B. Polymeren, kann über Physisorption oder gezielte chemische Bindung an die Oberfläche (Chemisorption) erreicht werden, wobei die Bedeckung durch Makromolekülschichten mit einem konstanten Volumenanteil, z.B. Polymervolumenanteil  $\varphi$  beschrieben werden kann. Die sterische Stabilisierung beruht auf einer ungünstigen Erhöhung der freien Energie des Systems bei Annäherung der Ligandenhüllen der Partikel aneinander. Durch eine Verringerung des Abstandes zwischen zwei Partikeln kommt es zu einer Berührung der Ligandenhüllen, sobald der Abstand  $D$  zwischen den Partikeloberflächen geringer wird als die doppelte Ligandenhüllendicke  $2 L_0$ . Eine weitere Annäherung führt entweder zu einer Kompression der Ligandenhülle, wodurch die Ligandenkonzentration zwischen den Oberflächen durch den geringeren Abstand erhöht wird, oder zu einer Interpenetration der Liganden, wodurch die lokale Ligandenkonzentration in bestimmten Bereichen verdoppelt wird (Abbildung 4). Die Erhöhung der lokalen Ligandenkonzentration führt durch die verminderte Beweglichkeit der Makromolekülfragmente zu einem Entropieverlust und zum Ansteigen der freien Energie und stellt somit die Grundlage der sterischen Stabilisierung dar. Da die Erhöhung der freien Energie mit sinkenden Abstand von  $D < 2 L_0$  nach  $D < L_0$ , ab dem eine Kompression der Ligandenhüllen unausweichlich ist, steil ansteigt, kann die sterische Stabilisierung speziell bei geringen Partikelabständen die durch attraktive *van-der-Vaals*-Kräfte induzierte Agglomeration verhindern.<sup>[24,37]</sup>



**Abbildung 4: Auswirkungen einer Annäherung von zwei sterisch stabilisierten Partikeln auf die Ligandenhülle.**

Ein weiterer Aspekt, der die Stabilität eines kolloidalen Systems beeinflusst, ist die Sedimentation. Bedingt durch die Gravitation neigt jedes Partikel, welches dichter als die disperse Phase ist, zur Sedimentation. Dabei sedimentieren größere Partikel schneller, wobei die *Brownsche* Molekularbewegung schwächer ausgeprägt ist als bei kleinen Partikeln. Durch induzierte Scherkräfte, z.B. starkes Rühren oder Ultraschall, können zwar lockere Agglomerate gelöst werden, jedoch auch durch Energieeintrag in das System die Partikel zu stärkeren Kollisionen und damit zur Überwindung der repulsiven Kräfte gebracht werden. Dies führt wiederum zur Bildung neuer Aggregate.<sup>[24]</sup>

### 3.3 Edelmetallnanopartikel

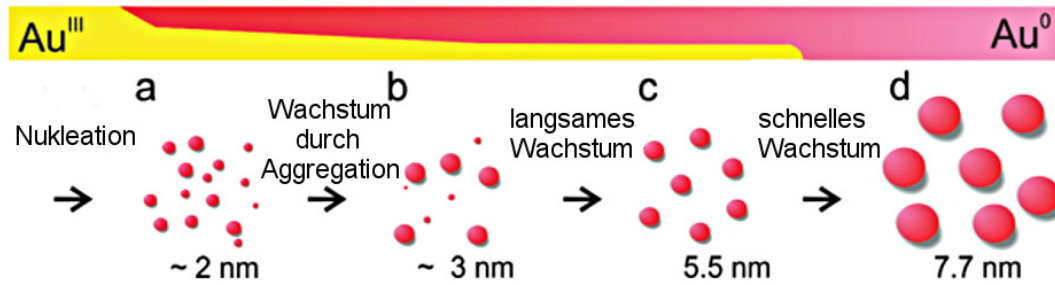
#### 3.3.1 Goldnanopartikel

Schon lange bevor es die ersten Ansätze in den Kolloid- und Nanowissenschaften gab, spielten Goldnanopartikel in der Chemie und im Handwerk eine Rolle. So wurde, zum damaligen Zeitpunkt noch ohne Kenntnis über die nanoskopischen Partikel, kolloidal verteiltes Gold schon im alten Rom zum Färben von Gläsern verwendet, vor allem in Form des rubinroten Farbpigmentes Goldpurpur. Die Entdeckung des Goldrubinglases im Jahre 1685 und die Synthese der dazu verwendeten Goldsole durch Ausfällen von Goldpartikeln mit einer Mischung aus Zinn und Zinnchlorid aus

einer Lösung von Goldionen in *aqua regia* werden *Johann Kunckel* und *Andreas Cassius von Leyden* zugeschrieben.<sup>[38]</sup> Die ersten systematischen Forschungsarbeiten an kolloidalem Gold gehen auf *Michael Faraday* zurück, der im Jahre 1857 Untersuchungen der vom Bulkmaterial abweichenden physikalisch-chemischen Eigenschaften von Goldnanopartikeln, synthetisiert durch eine Reduktion von  $\text{AuCl}_4^-$  mit Phosphor, in einer wissenschaftlichen Studie veröffentlichte.<sup>[23,39]</sup> Im Zuge seiner Studien erkannte *Faraday* an Hand von mechanischen Kompressionsexperimenten mit dünnen Filmen aus nanopartikulärem Gold, dass kolloidales Gold im metallischen Zustand vorliegt. Er begründete damit die Forschung an Metallkolloiden.<sup>[36,40]</sup> In der modernen Chemie hat Gold speziell in der Nanotechnologie einen hohen Stellenwert eingenommen. Die heutige Forschung bedient sich zweier grundlegender Synthesewege um nanoskopische Objekte mit unterschiedlichen Dimensionen, Funktionalisierungen und Morphologien zu generieren. Im *Top-Down*-Ansatz werden aus makroskopischem Bulkmaterial zum einen mittels Energieeintrag durch z.B. einen Laser, FIB (*focused ion beam milling* - Ionenfeinstrahlanlage) oder Nanolitographie, zum anderen durch Abscheidungsverfahren wie z.B. Sputterdeposition Strukturen oder Partikel im Nanometermaßstab generiert.<sup>[41]</sup> Diese Prozesse eignen sich besonders für nanostrukturierte Oberflächen und Substrate. In fluidem Medium disperse metallische Nanopartikel, speziell auch Goldnanopartikel, können über einen Laserablationsprozess generiert werden. Dabei kann durch Zugabe eines geeigneten Liganden zur kontinuierlichen Phase eine erhöhte Stabilität oder gewünschte chemische Funktionalisierung erlangt werden.<sup>[42,43]</sup> Der zweite Syntheseweg, *Bottom-Up*-Prozess genannt, beschreibt eine präparative Darstellung von Nanopartikeln durch einen Kristallisations- und Wachstumsprozess, ausgehend von atomaren Teilchen, welche aus geeigneten molekularen oder ionischen Präkursoren generiert werden. Ein *Bottom-Up*-Ansatz zur Goldnanopartikelsynthese stellt typischerweise eine nasschemische Reaktion dar, in der Gold(I)- oder Gold(III)-Ionen in einem geeigneten Lösungsmittel mit Hilfe von variierenden Reduktionsmitteln in Gegenwart eines stabilisierenden Liganden zu Atomen reduziert werden, die anschließend zu Keimen und letztlich zu Nanopartikeln wachsen. Dieser Ansatz, Nanopartikel aus der kleinsten chemisch

zugänglichen Dimension heraus in größere heranwachsen zu lassen, bringt eine hohe Variabilität hinsichtlich der Eigenschaften der synthetisierten Nanopartikel mit sich und ist daher in der Kolloidforschung weit verbreitet. Es lässt sich Einfluss auf die Partikelgröße, Morphologie, Zusammensetzung und Funktionalisierung nehmen. Hinsichtlich der Partikelgröße werden ultrakleine Nanopartikel, jedoch speziell Goldnanopartikel, oft eingeteilt in Unterklassen. Partikel mit Durchmessern  $< 2$  nm werden zumeist als Cluster oder Nanocluster bezeichnet und weisen trotz des metallischen Zustandes physikalisch-chemische Eigenschaften auf, die sehr nahe bei molekularen Zuständen liegen.<sup>[27,44–46]</sup>

Eine der prominentesten nasschemischen Synthesen von sphärischen Goldnanopartikeln ist die Reduktion von Tetrachlorogoldsäure mit Natriumcitrat, zurückgehend auf *Turkevich* et al.<sup>[47]</sup> Auf Grund der Zuverlässigkeit und der unkompliziert umsetzbaren Synthese wurde diese Methode in vielen Varianten adaptiert und untersucht.<sup>[48,49]</sup> In einer aktuellen Untersuchung des Wachstumsmechanismus mittels SAXS (*small-angle X-Ray scattering*, Röntgenkleinwinkelstreuung) und XANES (*near-edge x-ray absorption fine structure*, Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie) von *Polte* et al. wurde ein vierstufiger Nukleationsmechanismus vorgeschlagen, der von der konventionellen *LaMer*-Theorie abweicht (Abbildung 5).<sup>[50]</sup> Durch Modifikation von Reaktionsparametern wie Temperatur oder Stoffmenge des Reduktionsmittels kann eine Größenkontrolle der resultierenden Nanopartikel in gewissem Rahmen erzielt werden. So lassen sich mit Varianten der *Turkevich*-Methode monodisperse Nanopartikel mit Durchmessern zwischen 10 nm und 40 nm synthetisieren.<sup>[36,47,49]</sup>



**Abbildung 5: Wachstumsmechanismus von Goldnanopartikeln in der Turkevich-Methode nach Polte et al.<sup>[50]</sup>**

Eine direkte Weiterentwicklung der *Turkevich*-Methode stellt die Erweiterung des Reduktionsmittels auf ein Gemisch aus Citrat und Tannin, einem natürlichen Polyhydroxyphenol, dar. Durch den Tanninzusatz wird die Reaktionszeit bedeutend verkürzt, und die Goldpartikel weisen eine deutlich erhöhte Stabilität auf.<sup>[51,52]</sup> Die Reduktion von Tetrachlorogoldsäure in wässrigem Medium ist eine vielseitige Syntheseroute und mit vielen verschiedenen Reduktionsmitteln möglich. So wurden u.a. Natriumborhydrid,<sup>[53,54]</sup> Ascorbinsäure,<sup>[55]</sup> THPC (*Tetrakis*(hydroxymethyl)-phosphoniumchlorid)<sup>[56]</sup> und Hydrochinon<sup>[57]</sup> als Reduktionsmittel etabliert. Ein alternativer Ansatz zur Synthese von Goldnanopartikeln in organischen Medien wurde 1994 von *Brust et al.* vorgestellt.<sup>[58]</sup> Die Darstellungsmethode beschreibt eine Reduktion von Goldionen in einem zweiphasigen Gemisch aus Wasser und Toluol, in dem die Goldionen über Phasentransfer in die organische Phase gebracht und dort in Gegenwart eines Thiolliganden, z.B. Dodecanthiol, mittels Natriumborhydrid reduziert werden. Da sich mit der sogenannten *Brust-Schiffrin*-Methode sehr kleine Goldnanopartikel, typischerweise zwischen 1 nm und 5 nm, in hoher Ausbeute herstellen lassen, wurde diese Synthese in vielen Varianten adaptiert und weiterentwickelt.<sup>[36,59]</sup> Unter anderem existieren analoge Synthesen in ein- und zweiphasigen Systemen<sup>[46,60]</sup> mit Thiolliganden unterschiedlicher Kettenlänge und Funktionalität,<sup>[61,62]</sup> sowie Amino- und Phosphanliganden.<sup>[63]</sup> Neben den genannten Darstellungsmöglichkeiten können Goldnanopartikel auch über Polyolprozesse<sup>[64]</sup> oder in mizellaren Nanoreaktoren<sup>[65]</sup> synthetisiert werden.

Die Wahl des Reduktionsmittels hat einen starken Einfluss auf die resultierende Partikelgröße, da mit zunehmendem Reduktionspotential die Zahl der gebildeten Keime steigt und das Wachstum der Partikel somit begrenzt wird. Um hingegen einen Einfluss auf die Morphologie der Partikel nehmen zu können, existieren mehrere Ansätze, die über eine Trennung der Nukleations- und Wachstumsprozesse unter Zusatz von sogenannten *site-blocking agents*, welche bestimmte Kristallflächen selektiv blockieren, ein anisotropes Wachstum der Partikel begünstigen. Unter den bekanntesten anisotropen nanoskopischen Goldpartikeln finden sich Nanostäbchen,<sup>[66–68]</sup> Nanoprismen,<sup>[69]</sup> und platonische Kristalle.<sup>[70]</sup>

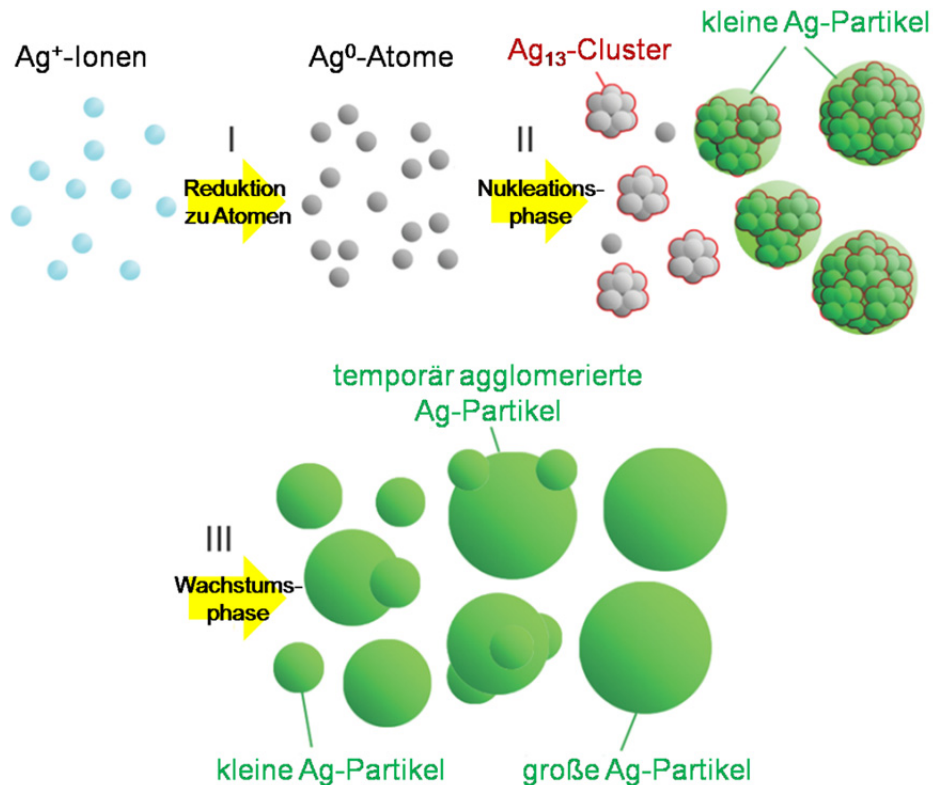
Neben den Möglichkeiten, Goldnanopartikel in unterschiedlichen Größen und Morphologien darzustellen, ist die vielfältige Auswahl an Oberflächenfunktionalisierungen ein Aspekt, der metallische Nanopartikel, vor allem aber Goldnanopartikel in den Fokus der Nanowissenschaften gerückt hat. Bedingt durch die Aurophilie des Schwefels, die nach dem *HSAB*-Prinzip zu einer Bindung mit hohem kovalenten Charakter zwischen der Thiolgruppe und der Goldoberfläche führt, lassen sich durch die Wahl eines geeigneten Thiolliganden unterschiedliche sehr stabile Oberflächenfunktionalisierungen realisieren.<sup>[71]</sup> Dadurch lassen sich unpolare Oberflächen, z.B. durch Alkanthiole<sup>[72]</sup> und polare Oberflächen, z.B. durch bifunktionale Thiole wie etwa 11-Mercaptoundecansäure<sup>[73]</sup> oder Liponsäure<sup>[53,74]</sup> für eine Dispergierbarkeit in verschiedenen Medien generieren. Auch Polymerliganden, z.B. PEG-SH (Polyethylenglykol),<sup>[75]</sup> finden eine breite Verwendung. Über eine Kopplungsreaktion an endständige funktionelle Gruppen können die Partikel umfunktionalisiert werden und bieten so eine Basis als Trägermaterial, z.B. für Spin- und Farbstofflabel oder Biomoleküle.<sup>[76]</sup> Durch die vielfältigen Möglichkeiten zur Modifikation von Partikelgröße, Morphologie und Oberflächenfunktionalität sowie der guten Biokompatibilität<sup>[77,78]</sup> stellen Goldnanopartikel ein sehr attraktives Material in der Nanowissenschaft dar und finden in vielen unterschiedlichen materialwissenschaftlichen,<sup>[79]</sup> biochemischen und zellbiologischen<sup>[16,17,42,80–82]</sup> sowie nanotechnologischen<sup>[66,80]</sup> Gebieten Anwendung. In der aktuellen biochemischen Forschung werden vor allem Einsatzmöglichkeiten in der



Gentherapie, der Krebstherapie und als Trägermaterial für kontrollierte Wirkstofffreisetzung untersucht.<sup>[11,83]</sup>

#### 3.3.2 Silbernanopartikel

Nanosilber ist in der modernen Nanochemie von großer Bedeutung und stellt ein ähnlich großes Forschungsgebiet wie Goldnanopartikel dar. Die Darstellung von Silbernanopartikeln kann über physikalische Prozesse wie etwa Ultraschall<sup>[84]</sup> oder Gasphasenabscheidung<sup>[85]</sup> erfolgen, jedoch sind nasschemische *Bottom-Up*-Synthesen auf Grund der Möglichkeiten zur Variation der Partikelgröße, Morphologie und Funktionalisierung wesentlich prominenter. Der am häufigsten verwendete Präkursor zur Darstellung von Silbernanopartikeln in nasschemischen Reduktionen ist Silbernitrat, da es in vielen polaren Lösungsmitteln gut löslich ist, und in weniger polaren Lösungsmitteln unter Verwendung von Tensiden mittels Ultraschall dispergiert werden kann. Die Reduktionsmittel, die in der Synthese von Nanopartikeln aus Silber(I)-Ionen Einsatz finden, sind vergleichbar mit denen der Goldnanopartikelsynthesen. In Anlehnung an die *Turkevich*-Methode, werden mit Natriumcitrat oder einem Gemisch aus Natriumcitrat und Tannin sphärische oder quasisphärische Nanopartikel mit durchschnittlichen Durchmessern zwischen 30 nm und 60 nm erhalten.<sup>[86–88]</sup> Aktuelle SAXS-Studien von *Takesue* et al. zum Mechanismus des Partikelwachstums während der Reduktion von  $\text{Ag}^+$ -Ionen mit Citrat oder einer Mischung aus Citrat und Tannin zeigten, dass innerhalb einer sehr kurzen Reaktionszeit von 6 ms eine Reduktion der  $\text{Ag}^+$ -Ionen zu Atomen und eine sofortige Nukleation von  $\text{Ag}_{13}$ -Clustern stattfindet. Im weiteren Verlauf der Nukleationsphase wachsen kleine Silbernanopartikel durch eine Aggregation der  $\text{Ag}_{13}$ -Cluster. Der anschließende langsame Wachstumsprozess führt durch Aggregation von kleinen Nanopartikeln mit weiteren Clustern oder Nanopartikeln zu größeren Silbernanopartikeln.<sup>[89]</sup>



**Abbildung 6: Wachstumsmechanismus von Silbernanopartikeln in der Citrat-Reduktion nach Takesue et al.**<sup>[89]</sup>

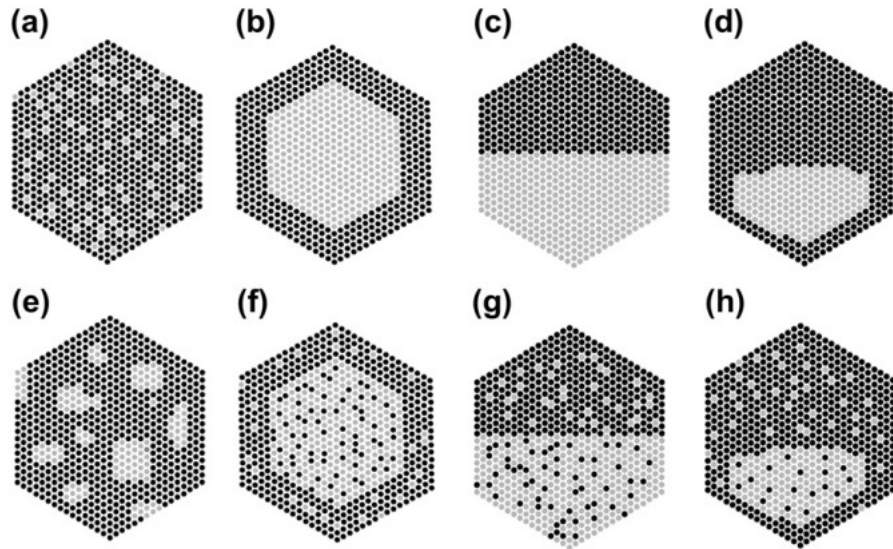
Eine Reduktion von Silber(I) mit Natriumborhydrid führt in Gegenwart von Stabilisatoren wie Thiolen, aber auch Biomolekülen wie Oligonucleotiden, zu kleineren Sphäroiden und Nanoclustern.<sup>[59,90,91]</sup> Analog zu Goldnanopartikeln können Silbernanopartikel auch durch Reduktion mit Hydrazin in mizellären Mikro- oder Nanoreaktoren synthetisiert werden.<sup>[92]</sup> Neben sphärischen Partikeln sind Silbernanopartikel in vielfältigen Morphologien zugänglich. Unter anderem können Nanostäbchen und Nanodrähte,<sup>[93–95]</sup> Nanowürfel,<sup>[96,97]</sup> Nanoplättchen<sup>[98]</sup> und pentagonal verzwilligte Nanostrukturen<sup>[99]</sup> dargestellt werden. Hervorzuheben sind dabei die häufig verwendeten Synthesen über Glukosereduktion<sup>[98,100]</sup> und Polyolprozesse, in denen Alkohole oder Polyole zugleich als Lösungsmittel und Reduktionsmittel genutzt werden.<sup>[93–96,101]</sup>

Ein besonderer Aspekt des Nanosilbers ist seine hohe bakterizide und zytotoxische Wirkung.<sup>[5,102,103]</sup> Durch diese Eigenschaft spielen Silbernanopartikel nicht nur in der Kolloidchemie, sondern auch in der Biochemie eine tragende Rolle. Die zytotoxische und bakterizide Wirkung

von Silbernanopartikeln wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht.<sup>[104–109]</sup> Neben Größeneffekten durch potentiell gebildete ultrakleine Sekundärpartikel<sup>[110]</sup>, wurden aus den Nanopartikeln gelöste Silberionen eindeutig als toxische Spezies identifiziert.<sup>[111,112,113,114]</sup> Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass die toxische Wirkung des Silbers auf Zellen und Bakterien von etwa gleicher Stärke ist und die Existenz eines breiten therapeutischen Fensters bezweifelt werden kann.<sup>[104]</sup> Trotz des schwer abzuschätzenden Risikos werden heutzutage mit Silbernanopartikeln beschichtete medizinische Artikel, z.B. Implantate, und Konsumartikel wie Wäsche, Haushaltsgeräte und elektronische Geräte auf Grund der antimikrobiellen Eigenschaften des Silbers angeboten.<sup>[4,6,103,115]</sup>

#### 3.3.3 Silber-Gold-Nanopartikel

Bimetallische Nanopartikel, besonders solche aus zwei Edelmetallkomponenten, haben in den letzten Jahren viel Beachtung in der Kolloidchemie erfahren. Dabei kann die Zusammensetzung von Nanopartikeln aus zwei verschiedenen Metallen modellhaft in drei unterschiedliche Typen eingeteilt werden (Abbildung 7).<sup>[116]</sup> Im Falle einer Mischbarkeit der beiden Metalle können legierte Nanopartikel entstehen, in denen beide Komponenten im Idealfall statistisch verteilt vorliegen (a). Des Weiteren kann sich ein *core-shell*-System ausbilden, in dem das eine Metall im Kern des Partikels vorliegt, während das zweite Metall eine Hülle um den Kern ausbildet (b). Eine dritte Möglichkeit ist die Komposit- oder Janusform, in der beide Metalle nebeneinander vorliegen (c). Diese drei Modelle sind allerdings nur Grenzformen. Es existieren viele unterschiedliche Mischformen der drei Zusammensetzungsarten, in denen reale bimetallische Nanopartikelsysteme vorliegen können (d-f).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung unterschiedlicher Zusammensetzungen bimettallischer Nanopartikel: (a): Statistische Legierung, (b): *Core-shell*, (c): Komposit oder Janus, (d): Asymmetrisches *core-shell*, (e): Unvollständige Legierung, (f), (g) und (h): Mischformen aus (a), (b), (c) und (d).<sup>[116]</sup>

In bimettallischen nanopartikulären Systemen können synergetische Effekte zwischen den beiden Metallen auftreten, die zu neuen physikalisch-chemischen Eigenschaften führen können. So wurde z.B. eine deutlich gesteigerte katalytische Aktivität von legierten Gold-Palladium- und Gold-Platin-Nanopartikeln gegenüber den monometallischen Partikelsystemen nachgewiesen.<sup>[117,118]</sup> Auch die Möglichkeiten zur Modifikation optischer Eigenschaften sind von großem Interesse, wie viele Untersuchungen zur Abhängigkeit der Plasmonenresonanz von der Zusammensetzung bimettallischer Silber-Gold-Nanopartikel zeigen.<sup>[119,120,121]</sup> Des Weiteren lassen sich über bimettallische Nanopartikel Eigenschaften zwei unterschiedlicher Systeme vereinen, z.B. im Falle von *core-shell*-Systemen, in denen eine Schale aus Platin oder Gold um einen nanoskopischen Eisenkern aufgebracht wird,<sup>[122]</sup> um chemisch nahezu inerte magnetische Nanopartikel zu synthetisieren.

Silber und Gold kristallisieren in der kubisch-flächenzentrierten Zelle und weisen sehr ähnliche Gitterkonstanten (Au: 4,0784 Å, Ag: 4,0857 Å) und Goldschmidtradien (Au: 1,4420 Å, Ag: 1,4445 Å) auf.<sup>[123]</sup> Die beiden Metalle lassen sich in allen Verhältnissen miteinander legieren. Auf Grund der

Ähnlichkeiten der kristallographischen Parameter und der vielseitigen Anwendungsbereiche der monometallischen Nanopartikel stellen Silber und Gold eine sehr prominente Elementpaarung für bimetallische Nanopartikelsysteme dar. Dabei stehen sowohl *core-shell*-Partikel als auch legierte Nanopartikel im Fokus der aktuellen Forschung.<sup>[124,125]</sup> Während *core-shell* Partikel zumeist in einem *seed-growth*-Prozess dargestellt werden, in dem zuerst ein monometallischer Kern synthetisiert wird, auf dem die ebenfalls monometallische Schale in einem darauffolgenden zweiten Reduktionsprozess aufgetragen wird<sup>[126–128]</sup> können zur Darstellung von legierten Silber-Gold-Nanopartikeln beide Metalle nebeneinander reduziert werden.

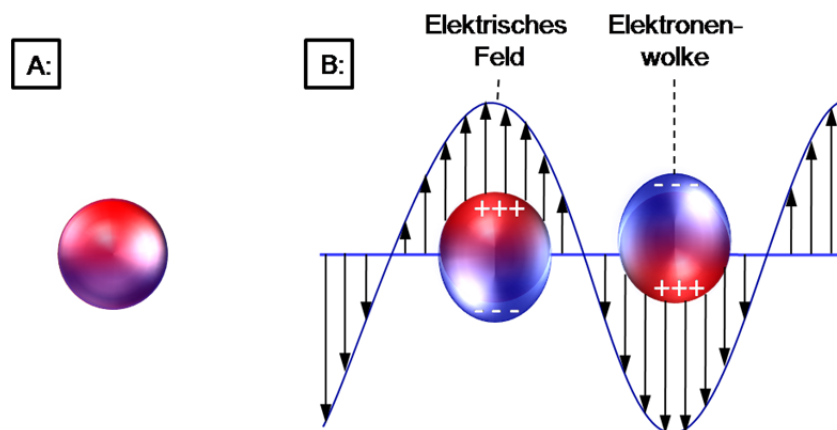
Dazu werden zumeist Tetrachlorogoldsäure und Silbernitrat als Präkursoren in einer wässrigen Lösung vorgelegt und dann mit Reduktionsmitteln wie Citrat<sup>[121,129]</sup> oder Glukose und Stärke<sup>[130]</sup> zu Nanopartikeln umgesetzt. Auch über eine Reduktion mit Hydrazin in mit AOT (Natriumdioctylsulfosuccinat) stabilisierten Wasser-in-Isooctan-Mirkoemulsionen,<sup>[131]</sup> über eine an die *Brust-Schiffrin* angelehnte Zweiphasenreaktion<sup>[132]</sup> und über Sol-Gel-Prozesse<sup>[118]</sup> sind legierte Ag-Au-Nanopartikel zugänglich. Weiterhin können physikalische und physikalisch-chemische Prozesse, wie eine Reduktion der Metallionen durch Ketylradikale, generiert durch Norrish-1-Photolyse von geeigneten photoreduzierenden Ketonen,<sup>[133]</sup> Laserablation von legierten Silber-Gold-Targets<sup>[134]</sup> oder sonochemische Methoden<sup>[135]</sup> zur Synthese verwendet werden. Ultrakleine Silber-Gold Nanopartikel oder Nanocluster sind hingegen in der Nanowissenschaft ein noch sehr junges Forschungsgebiet, und nur wenige Syntheserouten sind bekannt. So wurden in der Literatur zur Darstellung dieser Cluster bisher parallele Umsetzungen von Silber- und Goldionen in Gegenwart von Glutathion<sup>[136]</sup> oder THPC (*Tetrakis*(hydroxymethyl)-phosphoniumchlorid)<sup>[137]</sup> mit Natriumborhydrid beschrieben. Des Weiteren wurden einige Cluster, z.B. der (AuAg)<sub>144</sub>(SR)<sub>60</sub>-Cluster<sup>[138]</sup> und ein 13-atomiger Ag<sub>7</sub>Au<sub>6</sub>-Cluster über eine galvanische Austauschreaktion von Mercaptobernsteinsäure-stabilisierten Ag-Clustern mit Tetrachlorogoldsäure synthetisiert.<sup>[139]</sup>

Während die optischen Eigenschaften von legierten Silber-Gold-Nanopartikeln intensiv erforscht wurden, ist deren zellbiologische Aktivität und der Mechanismus ihrer toxischen Wirkung in Abhängigkeit von der Partikelzusammensetzung noch nicht verstanden. Die wenigen durchgeführten Studien deuten jedoch auf einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen zytotoxischem Effekt der Partikel und dem Silbergehalt der nanoskopischen Legierung hin.<sup>[134,140,141]</sup> So zeigten toxikologische Untersuchungen von legierten Ag-Au-Citrat-Nanopartikeln an *Daphnia Magnia* einen erhöhten toxischen Effekt im Falle von hohen Gold-Anteilen in den Partikeln, in diesem Fall Ag:Au-20:80, während für Nanopartikel mit hohem Silberanteil, in dieser Studie Ag:Au-80:20, eine vergleichsweise geringe Toxizität gefunden wurde.<sup>[140]</sup> In kürzlich veröffentlichten Studien zeigten *Tiedemann et al.* und *Grade et al.* eine offensichtliche Reduktion der silberinduzierten Toxizität durch zulegierte Goldanteile in Ag-Au-Nanopartikeln.<sup>[134,141]</sup> Die in den Studien verwendeten Nanopartikel wurden durch Laserablation dargestellt und zeichneten sich durch eine statistische Verteilung der Metalle innerhalb der Legierung aus. Die Untersuchungen an Cumuluszellen-Oozyt-Komplexen (*cumulus-oocyte complexes*, COCs) und Spermatozoen zeigten, dass ein toxischer Effekt erst ab einem Silberanteil von über 50 mol% auftrat. Dieser toxische Effekt war zudem niedriger als die auf Grund des Silberanteils zu erwartende Toxizität.<sup>[141]</sup> Vergleichbare Effekte wurden in Untersuchungen an humanen Gingivafibroblasten (HGF) und *Staphylococcus Aureus* beobachtet.<sup>[134]</sup>

#### **3.4 Optische Eigenschaften von Silber- und Goldnanopartikeln**

Ein charakteristisches Merkmal von Silber-, Gold- und ihren bimetallischen Nanopartikeldispersionen ist eine deutlich sichtbare Farbe. Dispersionen, die sphärische Goldnanopartikel enthalten, weisen häufig Farben zwischen kirschrot und violett auf. Dispersionen von sphärischen Silberpartikeln haben oft eine gelbe, gelbgrüne oder gelbbraune Färbung. Die Farbe von legierten sphärischen Ag-Au-Nanopartikeln liegt zwischen Gelb und Rot. Des Weiteren können im Falle von ultrakleinen Nanopartikeln unter sichtbarem Licht farblose und optisch transparente Dispersionen vorliegen, die unter UV-Licht eine starke Fluoreszenz zeigen.

Die Ursache für die Farbigkeit von Edelmetallnanopartikeldispersionen liegt in der Resonanz von lokalisierten Oberflächenplasmonen begründet. Diese kann durch Bestrahlen der Dispersion mit elektromagnetischer Strahlung mit einer Wellenlänge  $\lambda$  deutlich größer als der durchschnittliche Durchmesser  $D_{NP}$  der Nanopartikel angeregt werden. Aus der Bedingung  $\lambda \gg D_{NP}$  resultiert ein elektrisches Feld mit quasistatischer elektrischer Feldstärke um die Nanopartikel. Elektronen im Leitungsband der Nanopartikel können bei Auftreffen der elektromagnetischen Strahlung geeigneter Wellenlänge in Form von kohärenten lokalisierten Plasmonenschwingungen angeregt werden (Abbildung 8), deren Resonanzfrequenz von der Partikelgröße, der Morphologie und Interpartikelabständen abhängt.<sup>[29,142–144]</sup> Die Anregung der Plasmonenresonanz kann in Form eines Absorptionsspektrums mit einem UV/Vis-Spektrometer aufgezeichnet und ausgewertet werden.

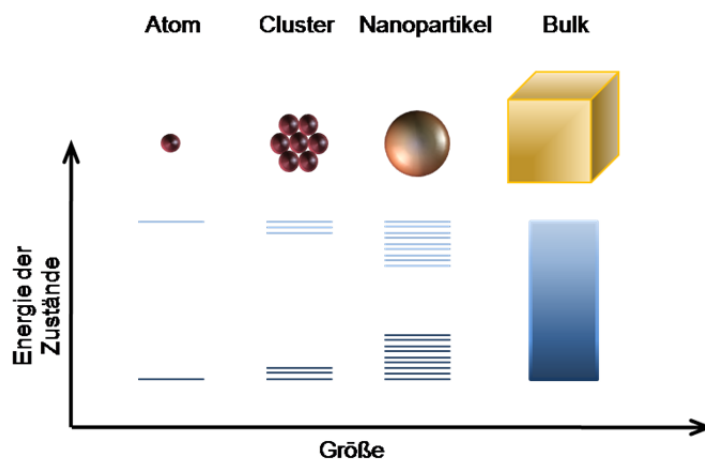


**Abbildung 8:** **A:** Nanopartikel ohne externe Anregung, **B:** Anregung der Elektronenwolke eines Nanopartikels durch ein elektrisches Feld.

Silber und Gold zeigen auf Grund der energetischen Lage von d-d-Übergängen lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) im sichtbaren Bereich, was zu dem charakteristischen Farbeindruck der Dispersionen führt. Als Folge der Abhängigkeit der LSPR-Absorption von Interpartikelabständen lässt sich die Agglomeration von Nanopartikeln oft visuell oder im gemessenen Absorptionsspektrum verfolgen. Zum Beispiel verändert sich die tiefrote Farbe einer kolloidalen Dispersion von sphärischen Au-Nanopartikeln bei Agglomeration der Partikel durch Verringerung der Interpartikelabstände auf Grund eines Rotshifts in der Absorption zu einer

blau-violetten Färbung. Aus einem aufgezeichneten LSPR-Spektrum lassen sich des Weiteren Informationen bezüglich der Partikelmorphologie erhalten. Während sphärische Nanopartikel eine Absorptionsbande mit einem Maximum aufweisen, zeigen Partikel mit anisotroper Morphologie wie etwa Nanorods oder Nanowürfel bi- oder multimodale Absorptionsspektren auf Grund mehrerer möglicher Polarisationsrichtungen.<sup>[142,143,145]</sup>

Ultrakleine Au- und Ag-Nanopartikel weisen von größeren Nanopartikeln verschiedene optische Eigenschaften auf, da sich die elektronische Zustandsdichte von einem kontinuierlichen Band ausgehend deutlich verringert (Abbildung 9). Unterhalb einer bestimmten Partikelgröße von etwa 2 nm verschwindet die Plasmonenresonanz völlig.<sup>[146]</sup> Unterhalb einer noch geringeren Größe, die vergleichbar mit der de-Broglie-Wellenlänge eines Elektrons an der *Fermi*-Energie ist (ca. 0,7 nm), weisen Nanopartikel nur noch diskrete elektronische Energiezustände auf, was ihnen molekülähnliche elektronische Eigenschaften verleiht.<sup>[44,147,148]</sup>

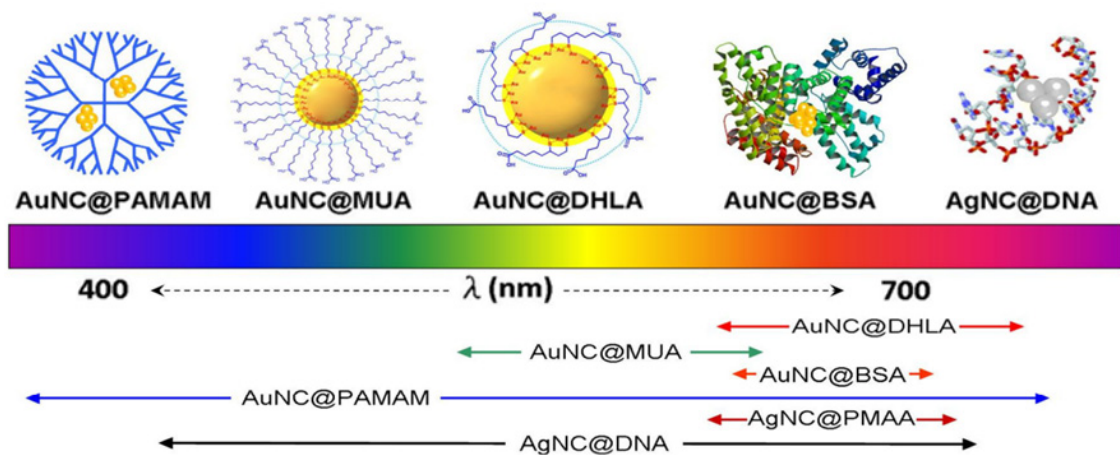


**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Anzahl und Energie elektronischer Zustände von Teilchen und Partikeln in Abhängigkeit von der Partikelgröße.

Durch Eintrag von elektromagnetischer Strahlung kann es bei geeigneter Wellenlänge zu Absorption und HOMO-LUMO-Anregung der Metallelektronen kommen, die unter Emissionsprozessen relaxieren und zur sichtbaren Fluoreszenz der Dispersion führen.<sup>[19,44,82,149]</sup> Als lumineszenter Vorgang wird im Falle von ultrakleinen Goldnanopartikeln eine radiative Relaxation aus zuvor angeregten  $5d \rightarrow 6sp$  Übergängen



vorgeschlagen.<sup>[146,150]</sup> Da die Energie der Bandlücke zwischen HOMO und LUMO durch die Anzahl der im Nanopartikel vorhandenen Atome und damit der Partikelgröße dirigiert wird, ist die Wellenlänge des emittierten Lichts abhängig vom Durchmesser des Nanopartikels.<sup>[151,152]</sup> Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen Intensität sowie Energie der emittierten Wellenlänge und dem verwendeten Liganden nachgewiesen (siehe Abbildung 10). Dies wird auf einen potentiellen, über die Au-SR-Bindung verlaufenden Ligand-Metall *charge-transfer*-Mechanismus zurückgeführt, über den Ladungsdichte in den metallischen Kern verschoben werden kann. Eine weitere Möglichkeit wird in einer direkten Donorfunktion von elektronenreichen Ligandenfragmenten gesehen. So wird die Besetzung der elektronischen Zustände des metallischen Kerns und damit auch die Fluoreszenzeigenschaft beeinflusst.<sup>[153,154]</sup>

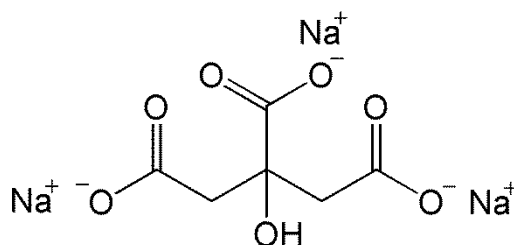


**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Korrelation zwischen emittierter Wellenlänge und stabilisierenden Liganden bei fluoreszenten Gold Nanoclustern.**<sup>[44]</sup>

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bimetallische Silber-Gold Nanopartikel

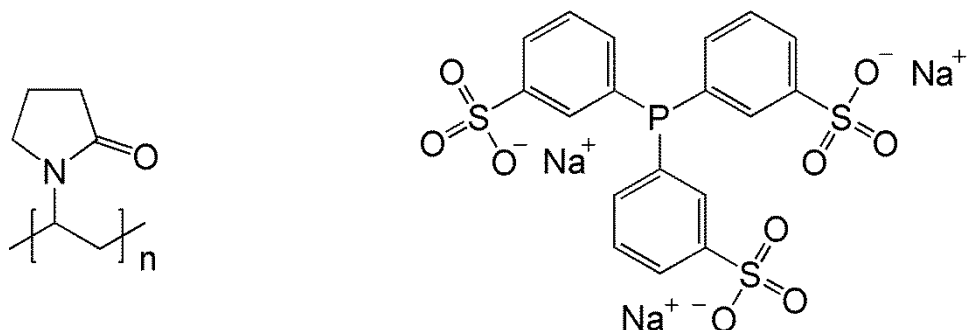
Um eine Syntheseroute zur Darstellung von legierten Silber-Gold-Nanopartikeln in wässrigem Medium zu etablieren, wurde die Citrat-Methode von *Turkevich* et al.<sup>[47]</sup> adaptiert, da diese nicht nur eine der prominentesten Synthesen für Goldnanopartikel darstellt, sondern bereits auch für Silber-Nanopartikel<sup>[86,87]</sup> und Ag-Au-Nanopartikel in bestimmten molaren Zusammensetzungen (Ag:Au-90:10, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80)<sup>[121,129,140]</sup> erfolgreich verwendet wurde. Von großem Vorteil bei dieser Synthese ist die geringe Anzahl an Reaktanden, wodurch die Komplexität des Reaktionssystems möglichst gering gehalten und eine anschließende Abtrennung der Nanopartikel von überschüssigen Reaktanden vereinfacht werden könnte. Neben den in Wasser gelösten Silber- und Goldpräkursoren wird zur Synthese der Nanopartikel ausschließlich Trinatriumcitrat (Abbildung 11), sowohl als Reduktionsmittel als auch als stabilisierendes Agens, verwendet.



**Abbildung 11: Strukturformel von Trinatriumcitrat.**

Über eine modifizierte *Turkevich*-Methode konnten bimetallische Citrat-stabilisierte Ag-Au-Nanopartikel in neun verschiedenen molaren Zusammensetzungen von Ag:Au-90:10, Ag:Au-80:20, Ag:Au-70:30, bis Ag:Au-10:90, sowie die jeweiligen Reinmetallpartikel als Kontrolle synthetisiert werden (siehe Abschnitt 4.1.1). Da sich die dargestellten Partikel auf Grund mangelnder kolloidaler Stabilität nur bedingt mittels Ultrazentrifugation aufreinigen ließen, wurde eine Umfunktionalisierung vorgenommen. Dazu wurde der Citrat-Ligand durch das sterisch stabilisierende Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP, Abbildung 12) substituiert,

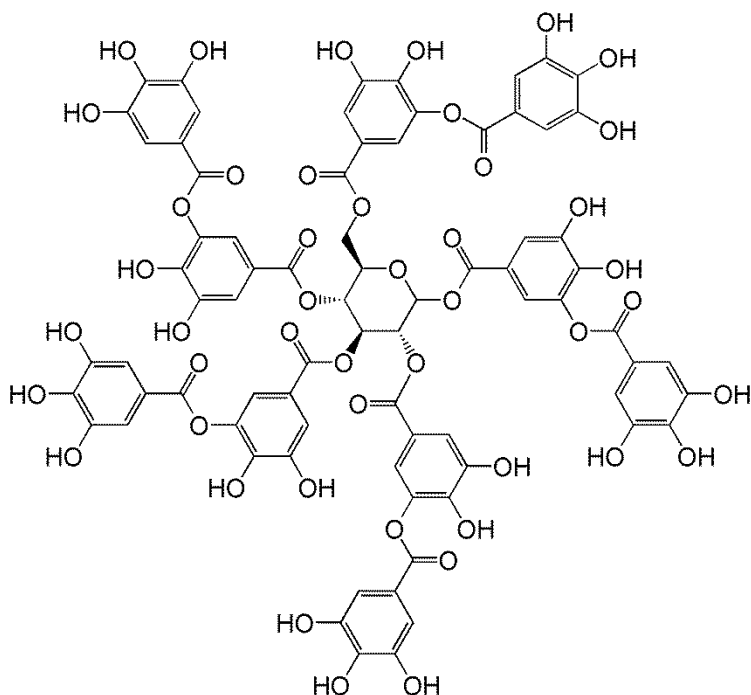
welches das Citrat nahezu quantitativ verdrängt.<sup>[155]</sup> Durch die hierdurch erhöhte Stabilität der Nanopartikel lassen sich aufgereinigte Ag-Au-Nanopartikeldispersionen realisieren.



Polyvinylpyrrolidon (PVP)    Tri-(natrium-*m*-sulfatophenyl)-phosphan (TPPTS)

**Abbildung 12: Strukturformeln von Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Tri-(natrium-*m*-sulfatophenyl)-phosphan (TPPTS).**

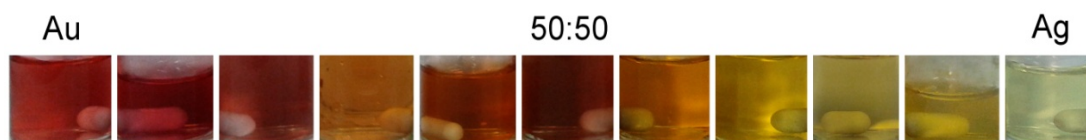
Auf Grund der mäßigen Reproduzierbarkeit und der nur geringen Monodispersität der mittels Citrat-Reduktion dargestellten Ag-Au-Nanopartikel wurde eine Weiterentwicklung der *Turkevich*-Methode untersucht, in der ein Gemisch aus Citrat und Tannin (Abbildung 13) als Reduktionsmittel verwendet wird. Am Beispiel von Goldnanopartikeln konnte durch die Zugabe von Tannin, einem stärkeren Reduktionsmittels als Citrat, eine deutlich verkürzte Reaktionszeit erreicht und bei unveränderten Reaktionsparametern kleinere und stabilere Nanopartikel erhalten werden.<sup>[51,52,125]</sup> Über eine Co-Reduktion von Tetrachlorogoldsäure und Silbernitrat mit einem Gemisch aus Trinatriumcitrat und Tannin konnten monodisperse Ag-Au-Nanopartikel in neun verschiedenen molaren Zusammensetzungen von Ag:Au-90:10 bis Ag:Au-10:90 sowie die jeweiligen Reinmetallpartikel als Referenz synthetisiert werden (siehe Abschnitt 4.1.2). Die erhöhte Stabilität der Dispersionen ließ eine Aufreinigung durch mehrmaliges Zentrifugieren zu, ohne eine Agglomeration der der Partikel zu induzieren.



**Abbildung 13: Strukturformel von Gerbsäure (Tannin).**

### 4.1.1 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit Trinatriumcitrat

Die modifizierte *Turkevich*-Methode, in der Silbernitrat, Tetrachlorogoldsäure oder ein Gemisch aus beiden Präkursoren mit Natriumcitrat in wässrigem Medium reduziert wurde, führte nach einer Reaktionszeit von einer Stunde zu farbigen Dispersionen. Der Farbumschlag nach Zugabe der Reduktionsmittel erfolgte langsam, wobei besonders bei Ansätzen mit höherem Goldanteil zuerst eine schwache Graufärbung zu erkennen war, die dann ins rosafarbene überging. Der finale Farbeindruck, je nach Zusammensetzung eine Rot-, Orange- oder Gelbfärbung, stellte sich dann nach einer Reaktionszeit von etwa 30 Minuten innerhalb weniger Sekunden ein. In Abbildung 14 ist die Farbe der Reinmetalldispersionen sowie der bimetalischen Nanopartikeldispersionen in neun verschiedenen molaren Zusammensetzungen von Ag: Au-10:90 bis Ag: Au-90:10 nach Ablauf der Reaktionszeit und Abkühlen gezeigt.



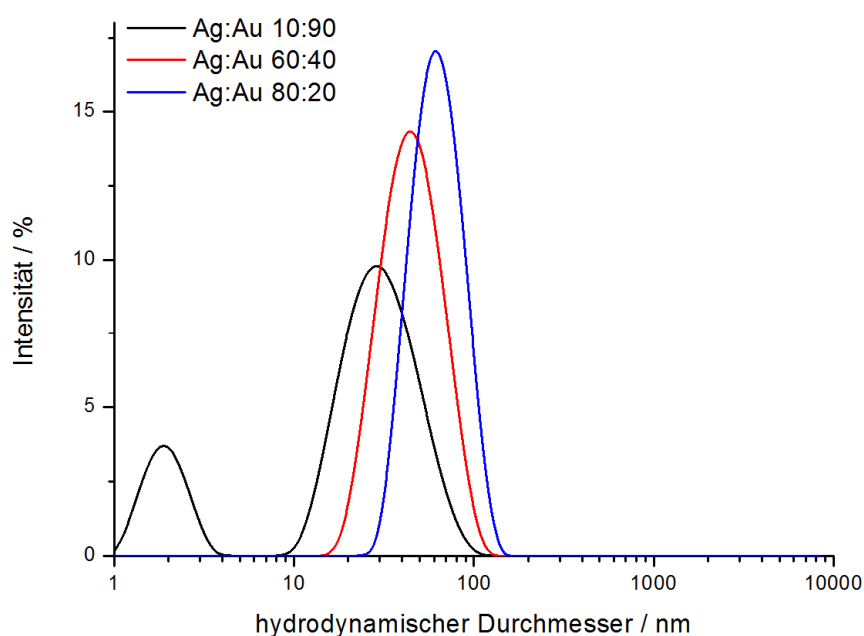
**Abbildung 14: Farbe von Silber-, Gold- und bimetallicen Silber-Gold-Nanopartikeln mit Zusammensetzungen von Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-90:10, synthetisiert mittels Citrat-Reduktion (unten ist der Rührfisch sichtbar).**

Die Citrat-stabilisierten bimetallicen Silber-Gold-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung und analytischer Scheibenzentrifugation (DCS, differentielle zentrifugale Sedimentation) untersucht und mit den monometallischen Nanopartikeln verglichen. Des Weiteren wurden mittels UV-Vis Spektroskopie Absorptionsspektren der Plasmonenresonanz aufgezeichnet, um Aussagen über den Legierungscharakter der Partikel treffen zu können. Die Stabilität der Citrat-stabilisierten Nanopartikel war generell nur gering, da sich die Nanopartikel nicht mittels Ultrazentrifugation aufreinigen ließen. Nach bereits einmaliger Zentrifugation für 30 min bei  $20.000 \text{ U min}^{-1}$  ( $29.400 \text{ g}$ ) war bei Dispersionen mit Silberanteilen über 50 mol% ein schwarzer fester Bodensatz zu beobachten, der sich nicht mehr redispergieren ließ. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei gleichen Parametern führte zur Aggregation sämtlicher Partikeldispersionen, unabhängig von der Zusammensetzung. Die Anfälligkeit der Partikel gegenüber Zentrifugalkräften ist höchstwahrscheinlich auf die ausschließlich elektrostatische Stabilisierung der Partikeloberfläche durch das kleine Citrat-Anion zurückzuführen. Da eine Abtrennung von überschüssigen Reaktionsprodukten und freiem Ligand nicht erreicht wurde, wurden die Partikelgrößenanalysen an nicht aufgereinigten Dispersionen vorgenommen. Hier muss beachtet werden, dass es durch die in der Probe verbleibenden Reaktionsbeiprodukte zu Verfälschungen der Analyseergebnisse kommen kann. Des Weiteren konnten keine elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhalten werden, da der überschüssige Anteil an organischer Substanz eine Anfertigung von repräsentativen Aufnahmen nicht zuließ.

Die DLS-Analysen an bimetallic Silber-Gold-Nanopartikeln ergaben für bimetallic Nanopartikel mit höherem Goldanteil (Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-50:50) große Polydispersitätsindices (PDIs) mit Werten von über 0,3, was auf eine hohe Polydispersität der Dispersionen schließen lässt. Die PDIs nahmen mit zunehmendem Silberanteil ab und deuten besonders bei Partikeldispersionen mit molarer Zusammensetzung von Ag:Au-20:80 (0,122) und Ag:Au-10:90 (0,172) auf eine monodisperse Partikeldispersion hin. Die Polydispersität spiegelte sich in den Messkurven wieder. So wiesen alle Messkurven für Proben mit einem  $PDI > 0,3$  eine multimodale Größenverteilung auf. Da die Angabe eines *z-Average* (durchschnittlicher Durchmesser, berechnet aus allen Moden) in einem solchen Fall keine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zulässt, wurde als hydrodynamischer Durchmesser der durchschnittliche Durchmesser der Mode mit der höchsten Intensität ermittelt. So wurde z.B. der mittels DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser von Ag:Au-10:90-Nanopartikeln (Abbildung 15, 1. Mode:  $d = 2$  nm, 2. Mode:  $d = 32$  nm) auf Grund der deutlich höheren Intensität der 2. Mode mit 32 nm angegeben. Des Weiteren wurden ausschließlich die Intensitätsverteilungen der Partikelgrößenanalysen zur Auswertung herangezogen, da eine mathematische Umrechnung von intensitätsgewichteten multimodalen Größenverteilungen polydisperser Proben keine sinnvollen Anzahl- oder Volumenverteilungen ergibt.

Aus den gemessenen Intensitätsverteilungen der bimetallic Nanopartikeldispersionen ergaben sich hydrodynamische Durchmesser zwischen 33 nm und 65 nm. Es war kein Trend zu beobachten, der die resultierende Partikelgröße mit der Zusammensetzung in Verbindung brachte. Die Referenzpartikel wiesen vergleichbare durchschnittliche hydrodynamische Partikeldurchmesser von 33 nm (Au) und 59 nm (Ag) auf. In Abbildung 15 sind die intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag:Au-10:90-, Ag:Au-60:40- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln dargestellt. Die Abnahme der Polydispersität mit zunehmendem Silberanteil ist deutlich zu erkennen. So weist die Ag:Au-10:90-Probe noch eine breite, bimodale Größenverteilung auf, während die Breite der monomodalen Verteilungen von Ag:Au-60:40 hin zu Ag:Au-80:20

abnimmt. Da die DLS-Messungen an nicht aufgereinigten Proben durchgeführt wurden, ist davon auszugehen, dass die Messungen zum Teil artefaktbehaftet waren. Ein Beispiel dafür ist in der Größenverteilungskurve der Ag:Au-10:90-Nanopartikel zu erkennen (Abbildung 15), in der eine der Moden auf Partikel mit durchschnittlichem hydrodynamischen Durchmesser  $d = 2$  nm hindeutet. Da die Streulichtintensität der in der DLS detektierten Partikel proportional zu  $d^6$  ist,<sup>[156,157]</sup> ist es jedoch äußerst unwahrscheinlich, dass diese Partikel in einer solch großen Anzahl tatsächlich in der Probe enthalten sind, und es sich wohl eher um ein Messartefakt bedingt durch die restlichen enthaltenen Reaktionsprodukte handelt.



**Abbildung 15: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln mit drei unterschiedlichen molaren Ag:Au-Verhältnissen, gemessen mit dynamischer Lichtstreuung.**

Analysen der modalen Durchmesser ergaben für die dargestellten Messkurven durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser von 33 nm (Ag:Au-10:90), 47 nm (Ag:Au-60:40) und 65 nm (Ag:Au-80:20). Der in dieser Darstellung scheinbare Trend einer Größenzunahme mit steigendem Silberanteil war zufällig und bestätigte sich nicht bei Betrachtung der Gesamtheit der Messergebnisse. Eine Übersicht über die durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser der Ag-Au-Nanopartikel mit neun

verschiedenen Kompositionen und der Reinmetallpartikel ist in Tabelle 2 dargestellt.

Zetapotentialmessungen ergaben für alle 11 Partikelsorten stark negative Werte unterhalb von -30 mV. Dies deutet auf eine starke elektrostatische Stabilisierung hin und ist ein Hinweis auf eine erfolgreiche Oberflächenfunktionalisierung mit negativ geladenen Citrat anionen. Die Werte aller Zetapotentialmessungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag:Au-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat als Reduktionsmittel.**

Ag:Au / mol%:mol%	Hydrodynamischer Durchmesser ( $D_h$ ) nach Intensität (DLS) / nm	Polydispersitäts- index	Zetapotential / mV
0:100	32	0,220	-54
10:90	33	0,528	-32
20:80	46	0,555	-37
30:70	38	0,606	-37
40:60	43	0,231	-37
50:50	56	0,612	-37
60:40	47	0,211	-42
70:30	33	0,211	-36
80:20	65	0,122	-42
90:10	48	0,172	-43
100:0	59	0,246	-46

Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung mittels DCS ergaben durchschnittliche Nanopartikeldurchmesser zwischen 13 nm (Ag:Au-10:90) und 33 nm (Ag:Au-80:20). Die reinen Silber- und Goldnanopartikel wiesen durchschnittliche Durchmesser von 13 nm bzw. 46 nm auf. Die Größenverteilungen hatten unabhängig von der Zusammensetzung einen monomodalen Charakter. Auf Grund des parallel zur Basislinie verlaufenden Signals im Bereich größerer Durchmesser  $d > 50$  nm konnten hochgradig agglomerierte Partikelsysteme ausgeschlossen werden. Analog zu den DLS-

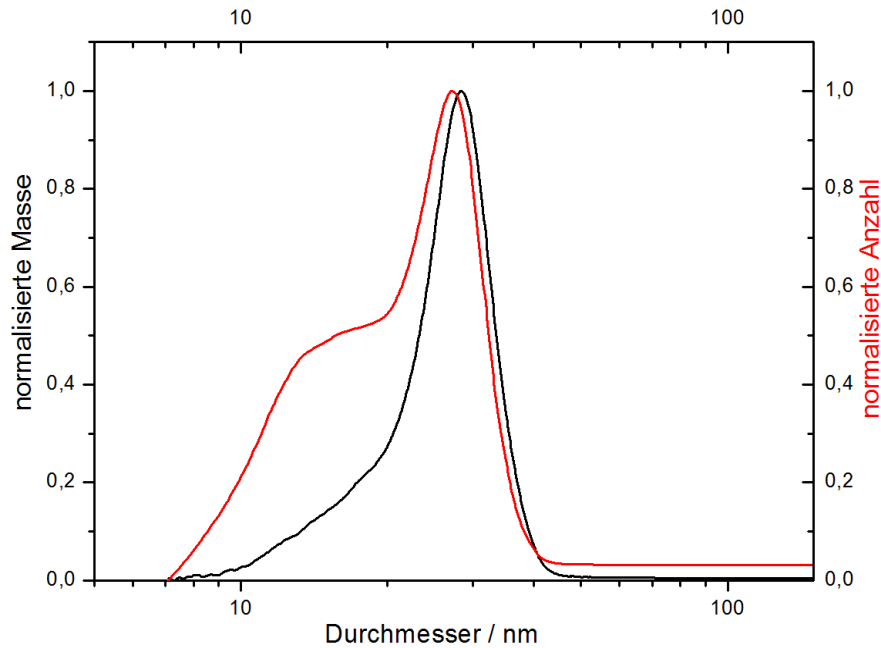


Messungen war auch in den DCS-Messungen kein zusammensetzungsabhängiger Partikelgrößentrend zu erkennen.

**Tabelle 3: Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche massegewichtete Partikeldurchmesser Citrat-stabilisierter Ag:Au-Nanopartikel und Reinmetallpartikel, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser.**

Ag:Au / mol%:mol%	<i>D</i> nach Masse (DCS) / nm	<i>D</i> nach Anzahl (DCS) / nm
0:100	13	12
10:90	13	12
20:80	20	19
30:70	27	24
40:60	29	27
50:50	22	16
60:40	25	23
70:30	18	17
80:20	29	28
90:10	33	33
100:0	46	43

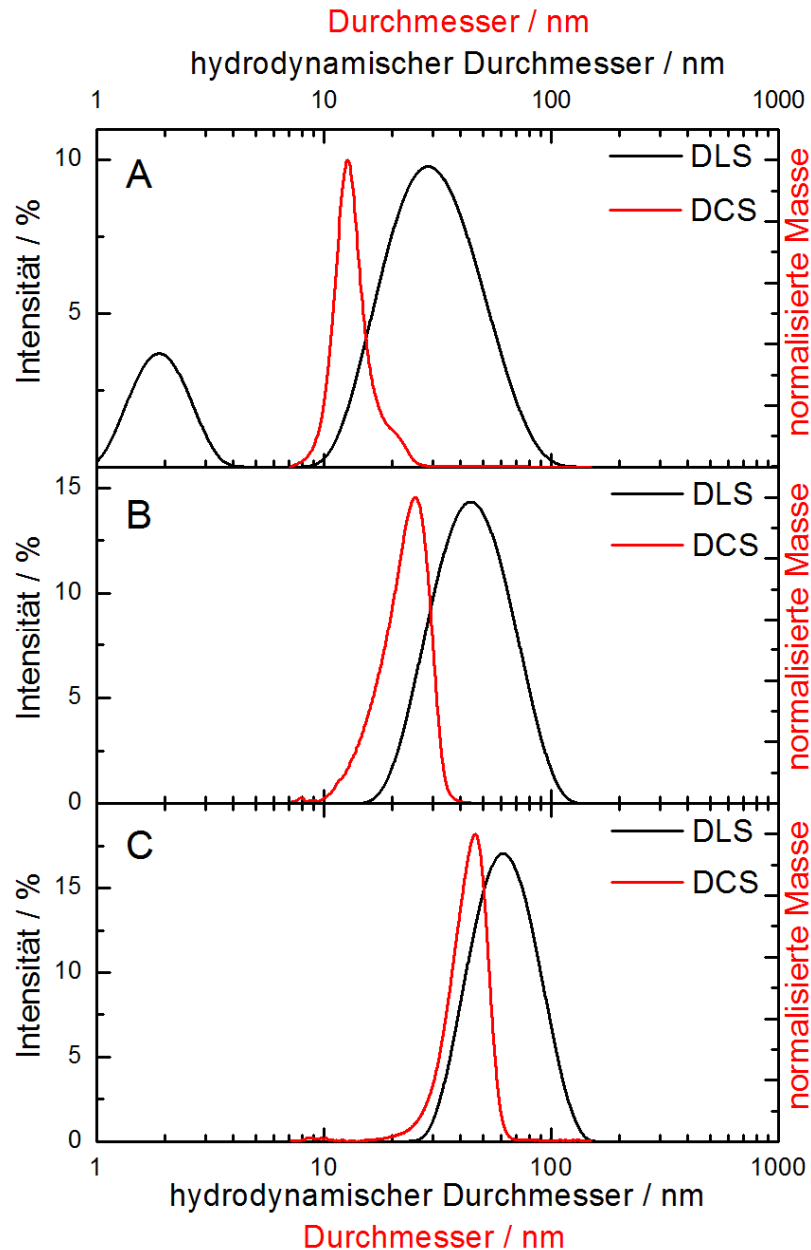
Die durch analytische Scheibenzentrifugation ermittelte Messgröße entspricht einem *Stokes*-Äquivalent, die Größenverteilungen werden typischerweise als Massenverteilung wiedergegeben. Aus den massegewichteten Partikelgrößenverteilungen lassen sich anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen errechnen, die, analog zu den DLS-Messungen, kleinere Partikel stärker gewichten und zumeist eher den aus elektronenmikroskopischen Daten ermittelten Partikelgrößen ähneln. In Abbildung 16 ist ein Vergleich von Massen- und errechneter Anzahlverteilung Citrat-stabilisierter Ag:Au-40:60-Nanopartikel dargestellt.



**Abbildung 16: Vergleich von normalisierter massegewichteter und anzahlgewichteter Partikelgrößenverteilung aus einer DCS-Messung von Citrat-stabilisierten Ag:Au-40:60-Nanopartikeln.**

Die durch DCS-Messungen ermittelten massegewichteten sowie die dazugehörigen errechneten anzahlgewichteten durchschnittlichen Partikelgrößen der Citrat-stabilisierten monometallischen und bimetalischen Ag-Au-Nanopartikel sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

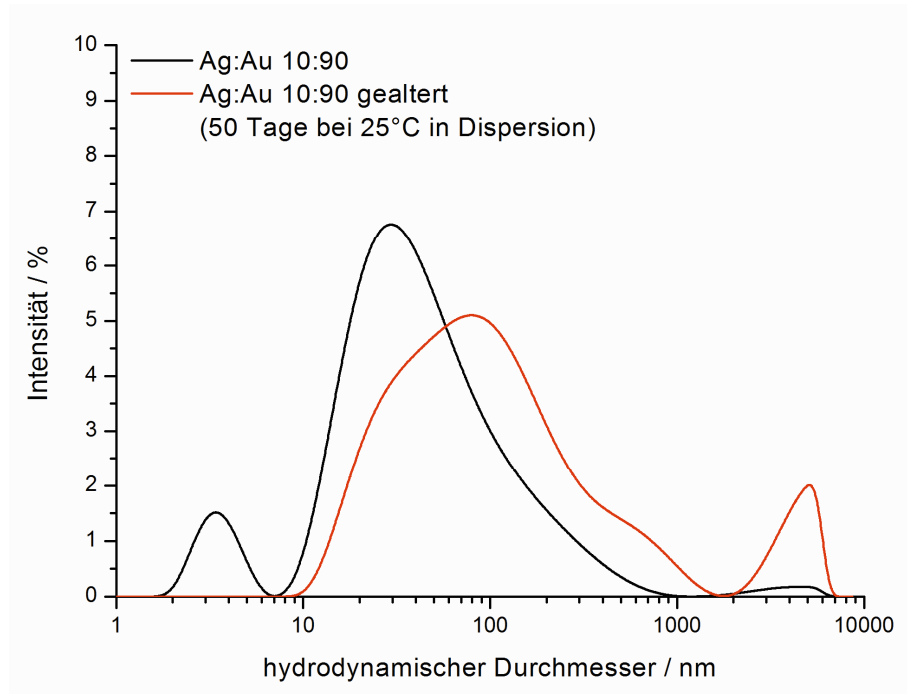
Ein Vergleich von intensitätsgewichteten DLS- und massegewichteten DCS-Messungen Abbildung 17 macht deutlich, dass die Scheibenzentrifuge kleinere Partikeldurchmesser findet. Dies ist unter anderem mit der unterschiedlichen Gewichtung der Messergebnisse (Intensität und Masse) zu erklären. Des Weiteren entspricht der hydrodynamische Durchmesser aus Lichtstreuungsexperimenten einem Partikel mit Liganden- und Hydrathülle, während die DCS eine Hydrathülle nicht berücksichtigt.



**Abbildung 17: Vergleich zwischen intensitätsgewichteten hydrodynamischen Partikelgrößenverteilungen aus DLS-Messungen und normalisierten massegewichteten Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen. A: Ag:Au-10:90-Nanopartikel, B: Ag:Au-60:40-Nanopartikel, C: Ag:Au-80:20-Nanopartikel.**

Die Langzeitstabilität der nicht aufgereinigten bimetallischen Nanopartikel wurde mit Hilfe der DLS untersucht. Hier zeigte sich, dass die elektrostatische Stabilisierung trotz eines Überschusses an Citrat in der nicht aufgereinigten Dispersion nicht ausreichte, um eine Agglomeration oder Aggregation der Partikel langfristig zu verhindern. In Abbildung 18 sind beispielhafte Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag:Au-

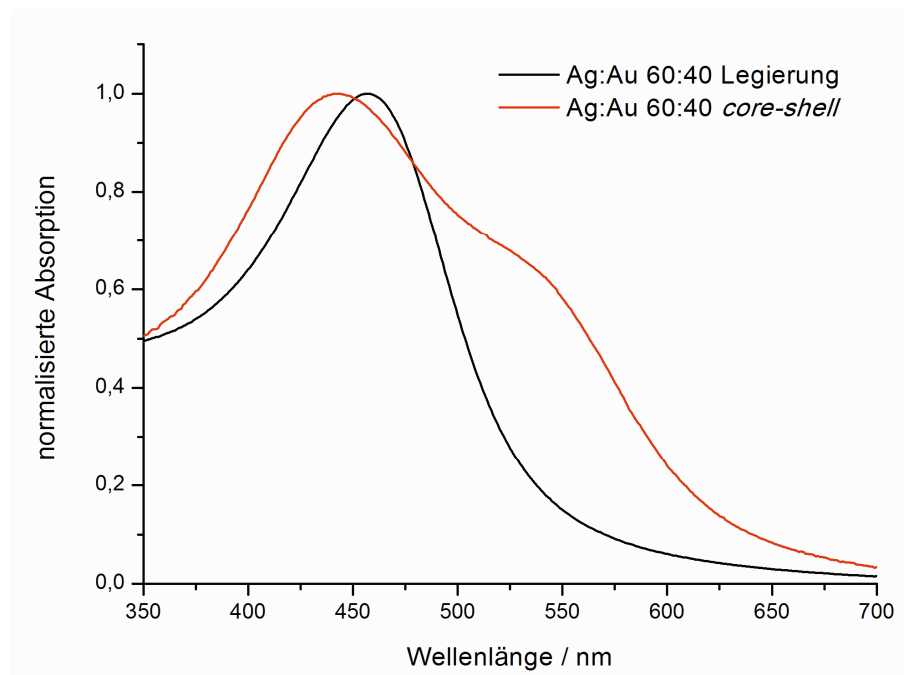
10:90-Nanopartikeln direkt nach der Synthese und nach 50 Tagen dargestellt. Es sind deutliche Agglomerationserscheinungen in der Intensitätsverteilung erkennbar.



**Abbildung 18: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag:Au-10:90-Nanopartikeln direkt nach der Synthese und nach 50 Tagen, gemessen mit DLS.**

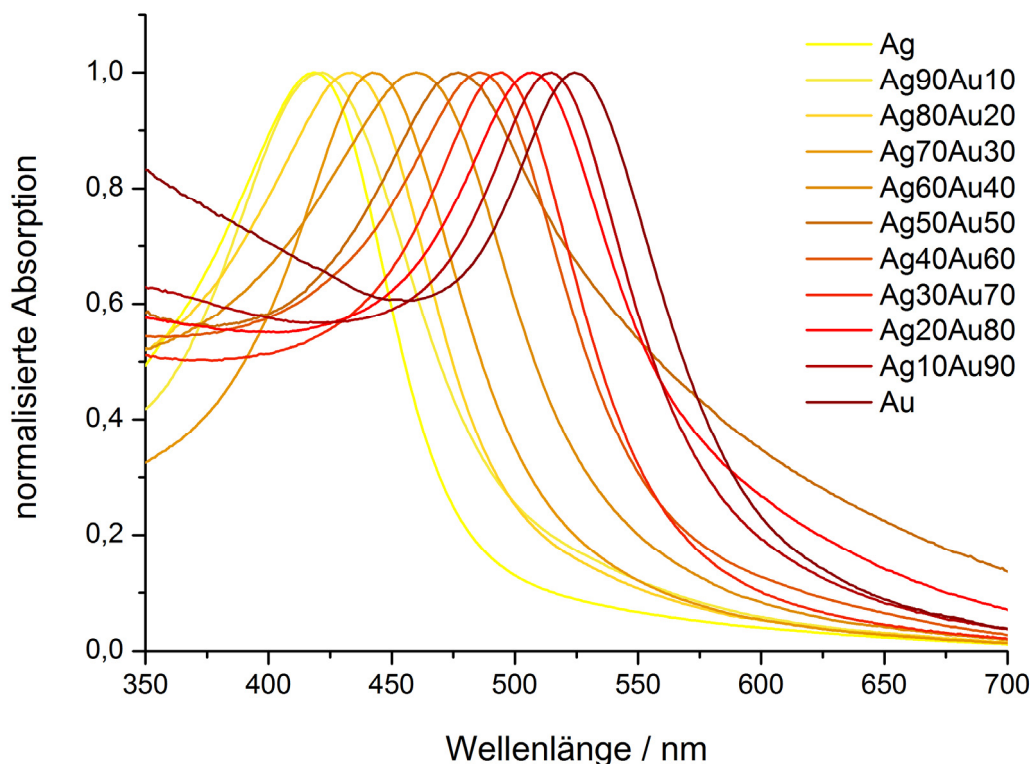
Um Aussagen über die innere Struktur der bimetallic Nanopartikel treffen zu können, wurden UV-Vis-Spektren aufgenommen. Der Verlauf von Plasmonenresonanzspektren der bimetallic Partikel kann als Hinweis auf Legierung, *core-shell* System oder binäres Gemisch aus Reinmetallpartikeln gedeutet werden. Während die Plasmonenbande im Falle eines heterogenen Gemisches aus sphärischen Ag- und Au-Nanopartikeln zwei Maxima bei Wellenlängen entsprechend der Reinmetallpartikel, je nach Partikelgröße um etwa 425 nm für Ag und 525 nm für Au, aufweist, ist bei legierten bimetallic Nanopartikeln eine Plasmonenbande mit nur einem Maximum zu erwarten. Dieses liegt, abhängig von der Zusammensetzung der Partikel, zwischen den Absorptionsmaxima der reinen Ag- und Au-Partikel.<sup>[120,121]</sup> Ein *core-shell* System hingegen kann zwei unterschiedliche Verläufe aufweisen. Im Falle einer größeren Hülle > 4 nm tritt nur ein Absorptionsmaximum auf<sup>[128]</sup>,

welches dem außen liegenden Metall entspricht. Im Falle einer dünnen Hülle weist die Plasmonenbande zwei Maxima auf, die ineinander übergehen können und aus der Plasmonenabsorption vom Hüllenmetall und der Phasengrenze zwischen Hüllen- und Kernmetall resultieren.<sup>[126,158]</sup> Exemplarisch sind in Abbildung 19 zwei Absorptionsspektren von Citrat-stabilisierten Ag:Au-60:40-Nanopartikeln dargestellt. Während eine Messkurve nur ein schmales Maximum aufweist, was auf eine Legierung schließen lässt, sind im zweiten Spektrum deutlich ein Maximum und eine breite Schulter zu erkennen, was als Indiz für eine *core-shell* Struktur oder ein Gemisch aus reinen Ag- und Au-Nanopartikeln gedeutet werden kann. Die Nanopartikel, von denen das in Abbildung 19 gezeigte Spektrum mit Schulter aufgenommen wurde, wurden mit den gleichen Edukten und bei gleichen Parametern synthetisiert wie die legierten Ag-Au-Nanopartikel. Lediglich die Zugabereihenfolge der Reaktanden wurde variiert. Das Reduktionsmittel wurde entsprechend einer Vorschrift für Ag-Au-*core-shell* Nanopartikel vorgelegt,<sup>[127]</sup> dann mit zeitlichem Versatz erst der Goldpräkursor zur Keimbildung und dann der Silberpräkursor zur Ausbildung der Hülle zugegeben.



**Abbildung 19: Absorptionsspektren von Citrat-stabilisierten Ag:Au-60:40-Nanopartikeln in legierter Form und *core-shell* Form (oder Gemisch).**

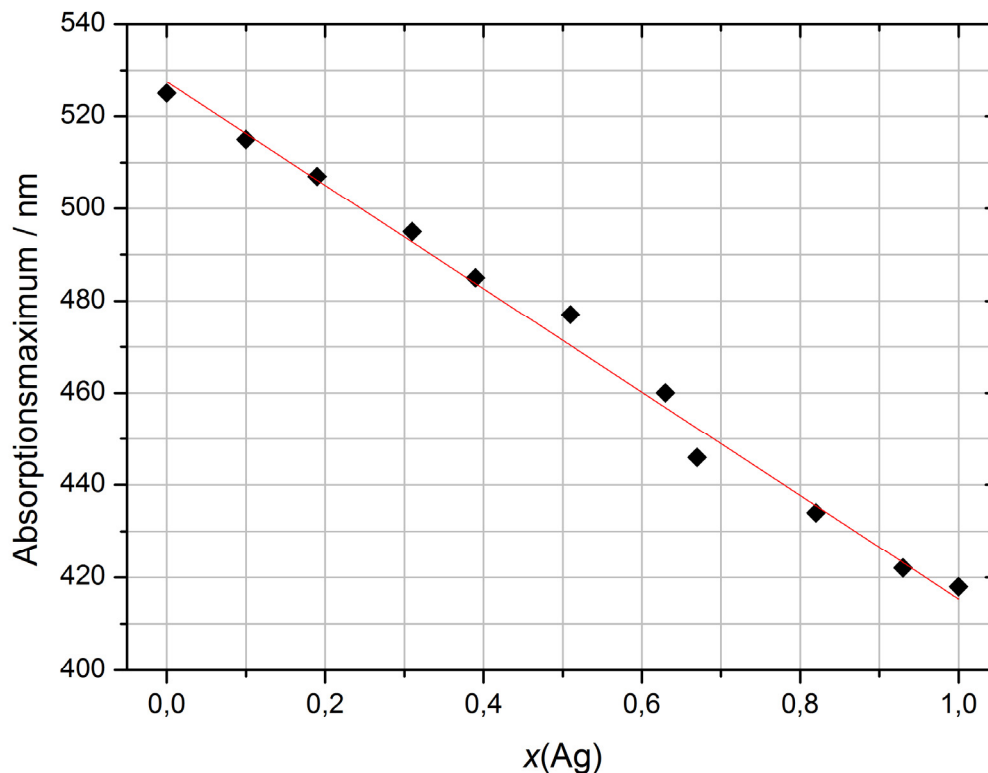
Die mittels modifizierter *Turkevich*-Methode dargestellten Citrat-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikel wiesen in den gemessenen Absorptionsspektren unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel nur ein Maximum auf, was darauf schließen lässt, dass die innere Struktur der Partikel hohen Legierungscharakter hat. In Abbildung 20 sind die Plasmonenabsorptionsspektren der bimetallicen Nanopartikel und der reinen Ag- und Au-Nanopartikel dargestellt.



**Abbildung 20: Normalisierte Absorptionsspektren von Citrat-stabilisierten bimetallicen Ag-Au-Nanopartikeln in neun unterschiedlichen Zusammensetzungen sowie von reinen Ag- und Au-Nanopartikeln.**

Im Falle einer statistischen Legierung wäre, der *Mie*-Theorie entsprechend, bei gleicher Partikelgröße und Funktionalisierung von reinen Goldnanopartikeln ausgehend ein linearer Blaushift des Absorptionsmaximums der bimetallicen Nanopartikel mit steigendem Silberanteil zu erwarten.<sup>[121,144]</sup> Eine Auftragung der Absorptionsmaxima der in Abbildung 20 gezeigten Plasmonenabsorptionsspektren gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  ist in Abbildung 21 dargestellt. Ein berechneter linearer Fit macht leichte Abweichungen der Absorptionsmaxima vom idealen linearen

Zusammenhang mit dem Molenbruch deutlich. Auf Grund der Polydispersität und der deutlichen Größenunterschiede der unterschiedlichen bimetallic Nanopartikel, die die Lage des Absorptionsmaximums beeinflussen, ist es jedoch nicht möglich, eine Abweichung vom linearen Zusammenhang allein auf Grund der inneren Struktur der Partikel zu betrachten. Es ist also trotz der leichten Abweichungen vom ideal linearen Zusammenhang zwischen Absorptionsmaximum und  $x(\text{Ag})$  davon auszugehen, dass die Verteilung der Elemente innerhalb der Partikel einer idealen Legierung ähnelt und keine Segregation der Metalle vorliegt.



**Abbildung 21: Auftragung der Maxima der Plasmonenabsorptionsbanden Citrat-stabilsierter Ag:Au-, Ag- und Au-Nanopartikel gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  mit berechnetem linearen Fit.**

### 4.1.2 Umfunktionalisierung mit PVP

Um eine erhöhte Stabilität durch Einbringen eines sterisch anspruchsvollen Liganden zu erzielen, wurden die Citrat-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel mit PVP umfunktionalisiert. Nach dem Aufbringen von PVP, welches das Citrat nahezu vollständig von der Partikeloberfläche verdrängt,<sup>[155]</sup> konnten die Partikel mittels Ultrazentrifugation vom überschüssigen Polymer und verbleibenden Reaktionsprodukten abgetrennt und in Reinstwasser redispergiert werden. Die aufgereinigten, PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel wurden hinsichtlich der Partikelgröße mittels DLS, DCS und REM untersucht, des Weiteren wurde die Morphologie durch Elektronenmikroskopie charakterisiert und mit Hilfe von UV-Vis Spektroskopie die Plasmonenabsorptionsspektren aufgezeichnet.

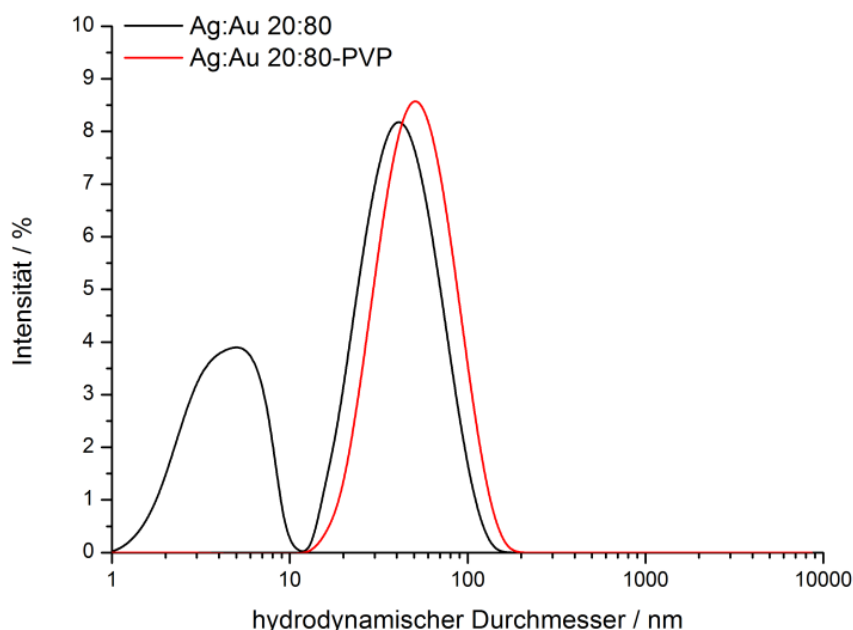
Um die Elementzusammensetzung der Nanopartikel zu bestimmen, wurden die Nanopartikelsysteme mittels AAS untersucht. Die analytisch ermittelten Zusammensetzungen (Tabelle 4) zeigen leichte Abweichungen von den theoretischen Werten, allerdings sind klare Unterscheidungen der unterschiedlichen Ag-Au-Partikelsysteme möglich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Nanopartikel im Folgenden ausschließlich mit ihrer theoretischen Zusammensetzung bezeichnet

**Tabelle 4: Bestimmung der molaren Zusammensetzung der mittels Citrat-Reduktion dargestellten bimetallic Ag:Au-PVP-Nanopartikel mittels AAS.**

Theoretische molare Ag:Au-Zusammensetzung	Molare Ag:Au-Zusammensetzung laut AAS
10:90	10:90
20:80	19:81
30:70	31:69
40:60	39:61
50:50	51:49
60:40	63:37
70:30	67:33
80:20	82:18
90:10	93:7



Die in der DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser der polymerstabilisierten Ag-Au-Nanopartikel lagen im Schnitt etwa 10 nm über den gemessenen Durchmessern der Citrat-stabilisierten Nanopartikel. Zudem zeigten alle Messkurven einen nahezu monomodalen Verlauf, mit Ausnahme von kleinen Moden im Bereich von mehreren Mikrometern, die in einigen Messungen aufgezeichnet wurden. Hierbei handelt es sich eventuell um Messartefakte. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers und das Fehlen von Moden im Größenbereich von 1-5 nm (vgl. Abbildung 15) wiesen auf eine erfolgreiche Funktionalisierung mit Polymer und eine effektive Abtrennung der Nanopartikel von überschüssigen in der DLS detektierbaren und störenden Reaktionsprodukten hin. In Abbildung 22 ist der Vergleich der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung von Citrat-stabilisierten Ag:Au-20:80-Nanopartikeln und PVP-stabilisierten Ag:Au-20:80-Nanopartikeln dargestellt.

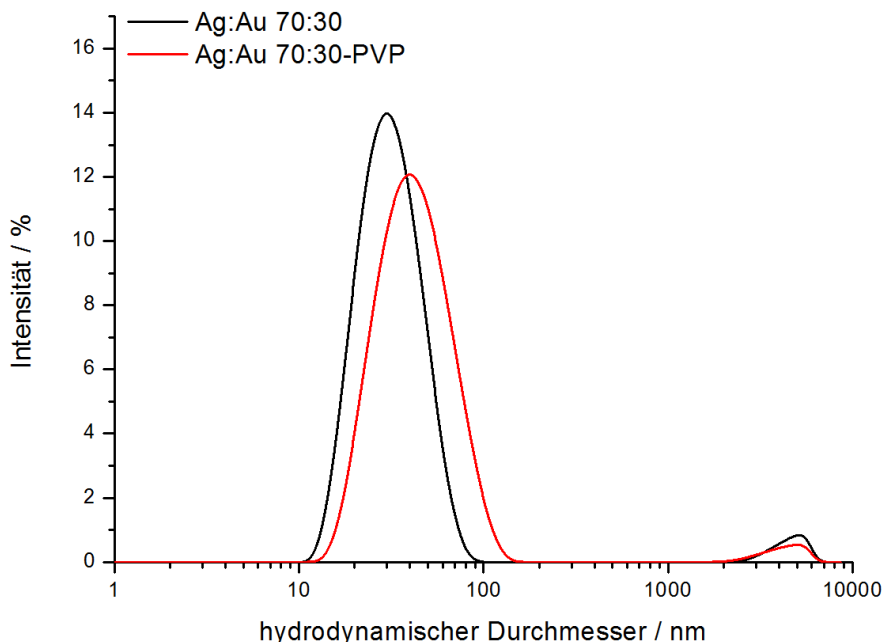


**Abbildung 22: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag:Au-20:80-Nanopartikeln und mit PVP umfunktionalisierten Ag:Au-20:80 Nanopartikeln, gemessen mit DLS.**

Der modale hydrodynamische Durchmesser der Ag:Au-20:80-PVP-Nanopartikel entsprach trotz der Polydispersität dem ermittelten *z-Average* von 56 nm und lag 10 nm über dem Durchmesser der Partikel vor der Umfunktionalisierung. Der Unterschied im hydrodynamischen Durchmesser

der Partikel vor und nach Umfunktionalisierung lag etwas unter den Literaturwerten für gleiche Experimente mit reinen Au-Nanopartikeln.<sup>[155]</sup> Dies ist mit der im Vergleich zur Literatur deutlich erhöhten Polydispersität zu erklären.

In Abbildung 23 sind die intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen von Ag:Au-70:30-Nanopartikeln vor und nach PVP-Funktionalisierung dargestellt. Eine Größenzunahme von 12 nm war zu beobachten. Trotz der erfolgten Aufreinigung der Partikel konnte keine Verringerung der PDIs beobachtet werden. Diese wiesen auch im Falle der polymerstabilisierten Nanopartikel eine ähnliche Verteilung auf, wie die der analogen Citrat-stabilisierten Nanopartikel. Besonders bimetallische Ag-Au-PVP-Partikel mit Goldanteilen von über 50 mol% zeigten PDIs von über 0,3 und damit eine deutliche Polydispersität. Dies deutet darauf hin, dass die gemessene Polydispersität der Ag-Au-Citrat-Partikel von den Partikeln und nicht von überschüssigen Reaktionsprodukten oder einer artefaktbehafteten Messung herrührte.



**Abbildung 23: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat-stabilisierten Ag:Au-20:80-Nanopartikeln und mit PVP umfunktionalisierten Ag:Au-20:80 Nanopartikeln aus DLS-Messungen.**

Eine Zusammenstellung aller hydrodynamischen Durchmesser der PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel sowie der Referenzpartikel ist in Tabelle 5 dargestellt. Analysen des Zetapotentials nach PVP-Funktionalisierung zeigten eine Abnahme der elektrophoretischen Mobilität und damit der Oberflächenladung. Da PVP ein ungeladenes Polymer ist, sprechen die verringerten Zetapotentiale, neben der Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers, ebenfalls für eine erfolgreiche Adsorption von PVP auf der Partikeloberfläche und für eine erfolgte Verdrängung oder Überlagerung des dreifach negativ geladenen Citrat-Anions und ähneln den in der Literatur genannten Werten für PVP-stabilisierte Au-Nanopartikel.<sup>[77,155]</sup> Die Zusammenfassung der Zetapotentiale aller Citrat-stabilisierten Nanopartikel ist in Tabelle 5 dargestellt.

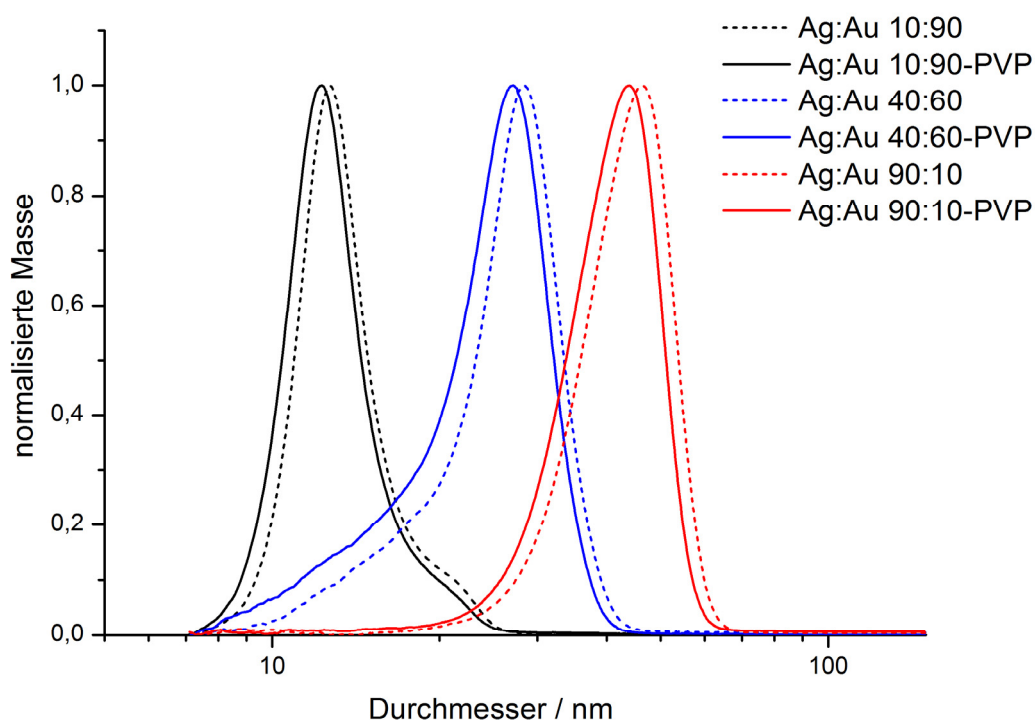
**Tabelle 5: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag:Au-PVP-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat als Reduktionsmittel.**

Ag:Au / mol%:mol%	$D_h$ nach Intensität (DLS) / nm	$\Delta(D_h)^*$ / nm	Polydispersitäts- index (PDI)	Zetapotential / mV
0:100	40	+8	0,605	-26
10:90	36	+3	0,569	-16
20:80	56	+10	0,591	-16
30:70	49	+11	0,485	-16
40:60	55	+12	0,244	-19
50:50	67	+9	0,553	-22
60:40	62	+15	0,229	-23
70:30	45	+12	0,223	-21
80:20	81	+16	0,096	-13
90:10	72	+13	0,182	-16
100:0	52	+4	0,172	-33

\* $\Delta(D_h)$  gibt den Unterschied der hydrodynamischen Durchmesser der Partikel vor und nach der PVP-Umfunktionalisierung an.

Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung mittels DCS zeigten monomodale Verteilungen, die im Vergleich zu den Citrat-stabilisierten Nanopartikeln leicht verringerte durchschnittliche Partikeldurchmesser

ergaben. Für PVP-stabilisierte Ag:Au-40:60-Nanopartikel wurde z.B. vor der Umfunktionalisierung ein durchschnittlicher Durchmesser von 29 nm aus der massengewichteten Partikelgrößenverteilung ermittelt, nach der Umfunktionalisierung betrug der Durchmesser 27 nm. Diese scheinbare Verkleinerung des durchschnittlichen Durchmessers zeigt eine erfolgreiche Polymerbeladung der Partikel an. Begründet werden kann dies mit der durch die Adsorption des PVP verringerte effektive Dichte der Partikel. Da die im Messprogramm vorgegebene theoretische Dichte derjenigen von unfunktionalisiertem Metall entspricht, erscheinen die Partikel in der DCS-Messung nach einer Polymeradsorption kleiner. Dieser Effekt ist literaturbekannt.<sup>[156,159]</sup> In Abbildung 24 sind drei repräsentative massengewichtete Partikelgrößenverteilungen von bimetallic Nanopartikeln mit unterschiedlichen Zusammensetzungen vor und nach der Umfunktionalisierung gezeigt, die die scheinbare Verkleinerung der polymerstabilisierten Nanopartikel verdeutlichen.



**Abbildung 24: Normalisierte massengewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an Citrat-stabilisierten Ag:Au-10:90-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-90:10-Nanopartikeln vor (gestrichelte Linie) und nach (durchgezogene Linie) der Umfunktionalisierung mit PVP.**

Die aus massegewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelten durchschnittlichen Durchmesser der PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Größendifferenz der Partikel zu den Citrat-stabilisierten Nanopartikeln betrug jeweils zwischen 1 und 2 nm. Aus den massegewichteten Größenverteilungen wurden zwecks Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzahlgewichtete Verteilungen errechnet (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche massegewichtete Partikeldurchmesser PVP-stabilsierter Ag-Au-Nanopartikel und Reinmetallpartikel, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser und aus REM-Aufnahmen ermittelte Durchmesser.**

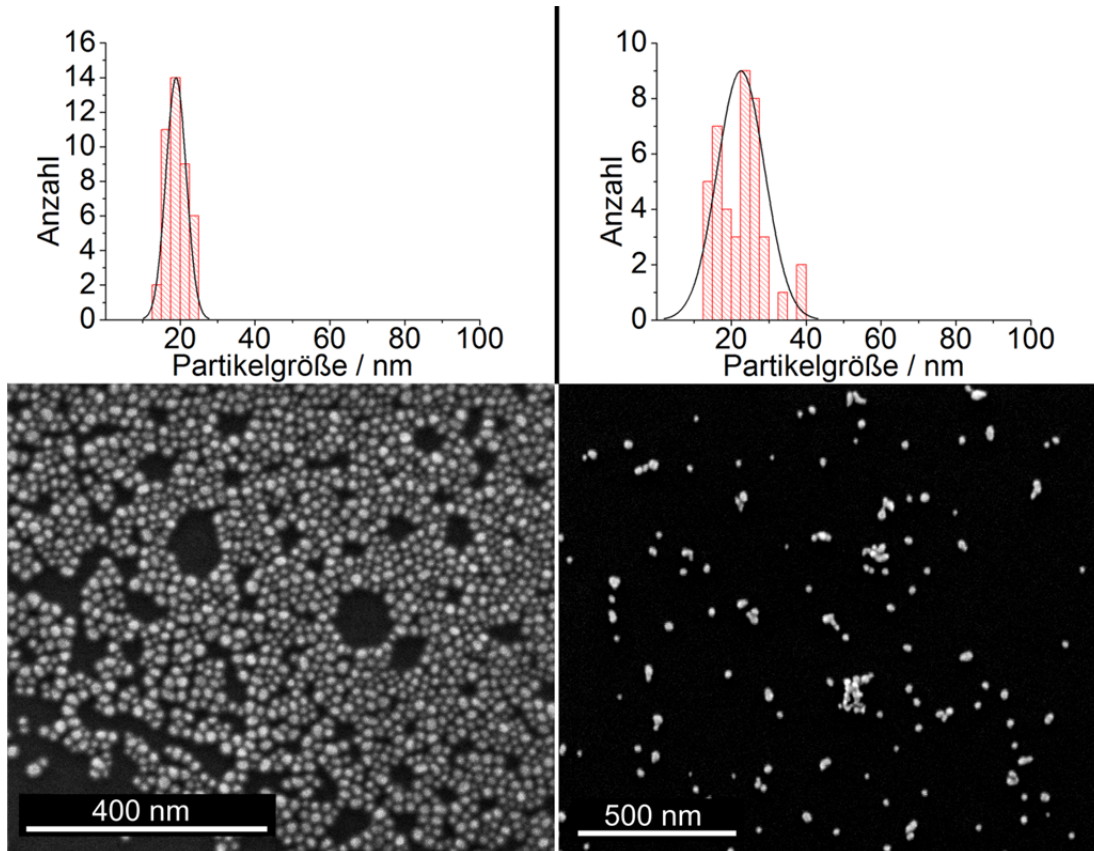
Ag:Au / mol%:mol%	D nach Masse (DCS) / nm	$\Delta(D)^*$ / nm	D nach Anzahl (DCS) / nm	D nach Anzahl (REM) / nm
0:100	11	-2	11	19±3
10:90	12	-1	12	19±4
20:80	20	n.s. <sup>#</sup>	18	23±5
30:70	26	-1	22	28±7
40:60	27	-2	26	30±6
50:50	20	-2	16	24±4
60:40	24	-1	21	30±8
70:30	18	n.s.	17	27±5
80:20	28	-1	27	34±7
90:10	32	-1	32	35±8
100:0	44	-2	41	71±11

\* $\Delta(D)$  gibt den Unterschied der Durchmesser der Partikel vor und nach der PVP-Umfunktionalisierung an.

<sup>#</sup>n.s.: Nicht signifikanter Größenunterschied.

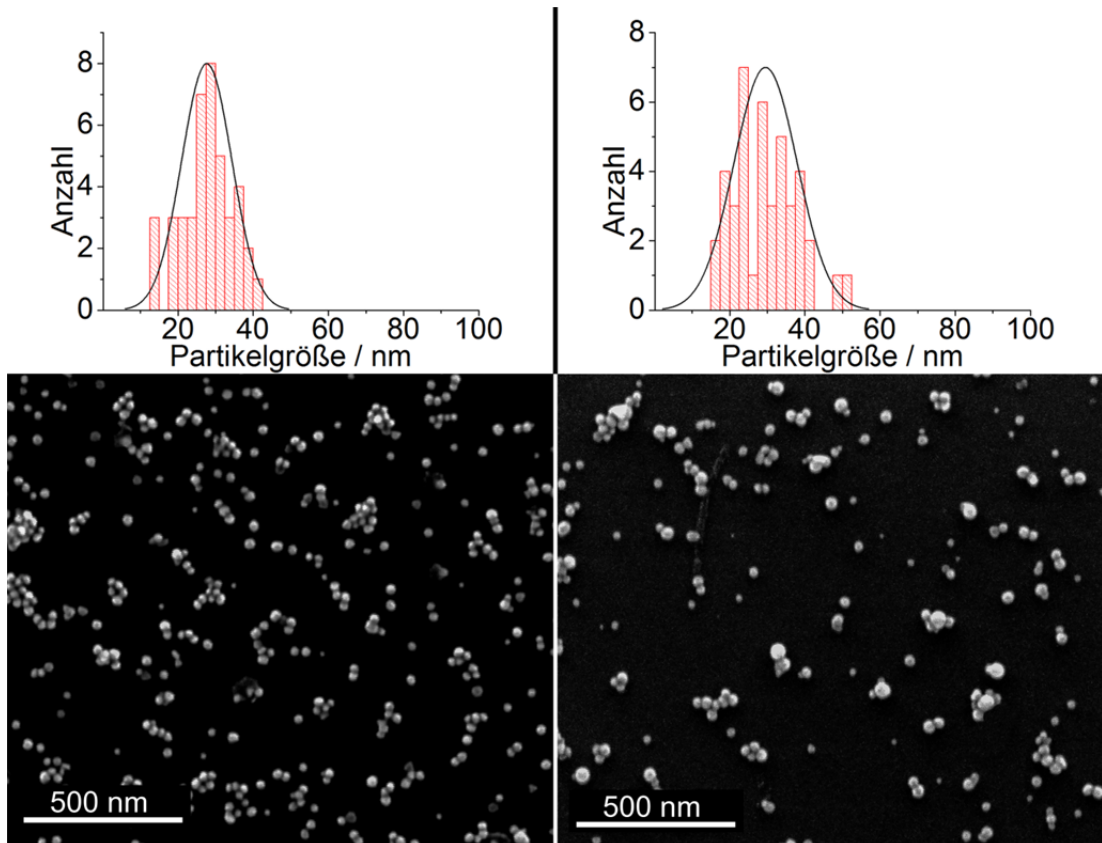
Zur weiteren Analyse von Partikelgröße und Morphologie wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel angefertigt. Die Aufnahmen zeigten, dass die bimetalischen Nanopartikel unabhängig von ihrer Zusammensetzung ausschließlich sphärische Morphologie aufwiesen. Die Partikelgröße wurde durch manuelles Vermessen von mindestens 50 Nanopartikeln und Erstellen eines Histogramms ermittelt. Die angegebene durchschnittliche Partikelgröße bezieht sich jeweils auf den modalen Durchmesser der erstellten Normalverteilung.

In Abbildung 25 sind REM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Goldnanopartikeln und PVP-stabilisierten Ag:Ag-20:80-Nanopartikeln dargestellt. Die ermittelten durchschnittlichen Durchmesser von 19 nm (Au) und 23 nm (Ag:Ag-20:80) weichen deutlich von den aus den anzahlgewichteten Größenverteilungen der DCS-Messungen ermittelten durchschnittlichen Durchmessern ab (11 nm bzw. 18 nm).



**Abbildung 25: REM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Au-Nanopartikeln,  $d = 19$  nm (links) und PVP-stabilisierten Ag:Ag-20:80-Nanopartikeln,  $d = 23$  nm (rechts).**

Abbildung 26 zeigt REM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-30:70- und Ag:Ag-40:60-Nanopartikeln mit durchschnittlichen Durchmessern von 28 nm und 30 nm. Auch diese Partikelgrößen liegen deutlich über den Werten aus der analytischen Scheibenzentrifugation (22 nm bzw. 21 nm). Ein Vergleich der Aufnahmen der drei bimetallischen Proben mit den Au-Referenzpartikeln zeigt eine deutlich erhöhte Polydispersität der Ag:Ag-Partikel, sowie mit steigendem Silberanteil eine Zunahme der Anzahl an größeren Nanopartikeln.



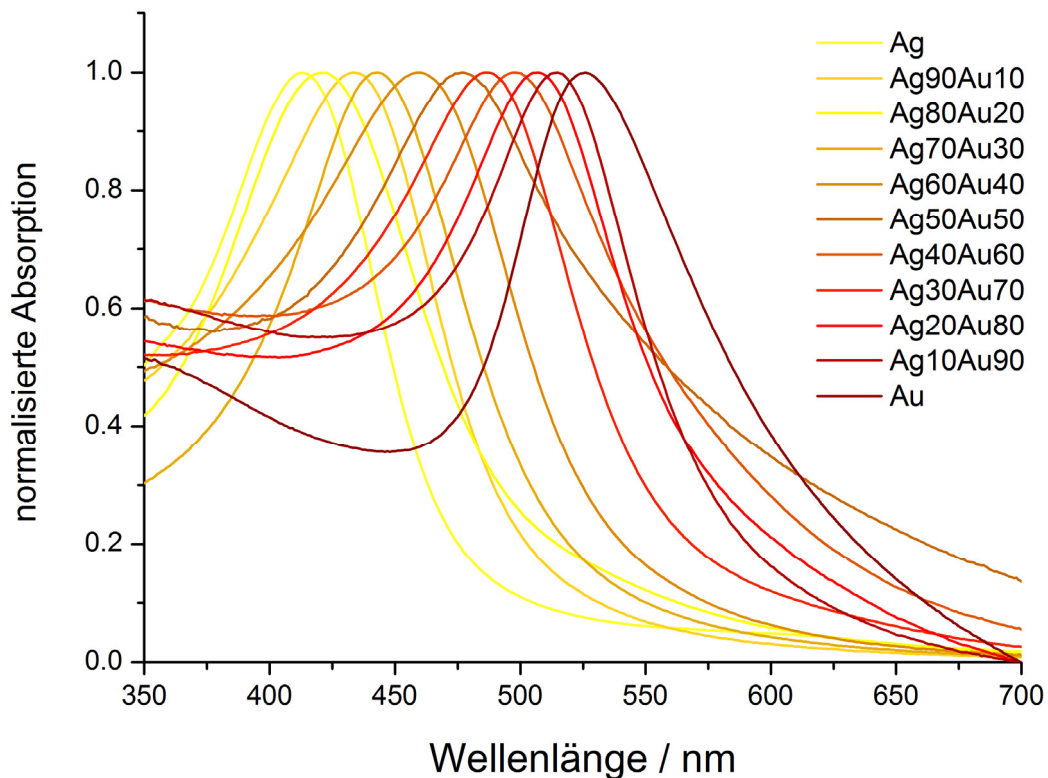
**Abbildung 26:** REM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-30:70-Nanopartikeln,  $d = 28$  nm (links) und PVP-stabilisierten Ag:Ag-60:40-Nanopartikeln,  $d = 30$  nm (rechts).

Die deutliche Diskrepanz zwischen den ermittelten Partikelgrößen aus DCS und REM lässt sich mit der deutlich erkennbaren Polydispersität der Partikel und der geringen Anzahl an Partikeln, die in der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen einbezogen wurden, erklären. Da eine REM-Aufnahme nur einen sehr geringen Anteil der Probe darstellen kann und daher eine im Vergleich zur Gesamtanzahl an Partikeln in der Probe nur sehr geringe Partikelzahl zur Histogrammauswertung verwendet wurde, ist es bei gegebener Polydispersität realistisch, dass die Messwerte aus REM-Aufnahmen nicht mit der Partikelgrößenverteilung aus der Scheibenzentrifuge übereinstimmen. Dennoch deutet ein Vergleich zwischen REM und DCS auf einen Trend hin, nach dem die aus REM-Bildern ermittelten Partikelgrößen stets über denen der DCS-Messungen liegen.

Die mittels modifizierter *Turkevich*-Methode dargestellten und mit PVP umfunktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel wiesen in den gemessenen Absorptionsspektren unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel nur



ein Maximum auf, was darauf schließen lässt, dass die innere Struktur der Partikel den hohen Legierungscharakter nach dem Ligandenaustausch beibehalten hat. In Abbildung 27 sind die Plasmonenabsorptionsspektren der aufgereinigten Nanopartikel nach PVP-Funktionalisierung dargestellt.

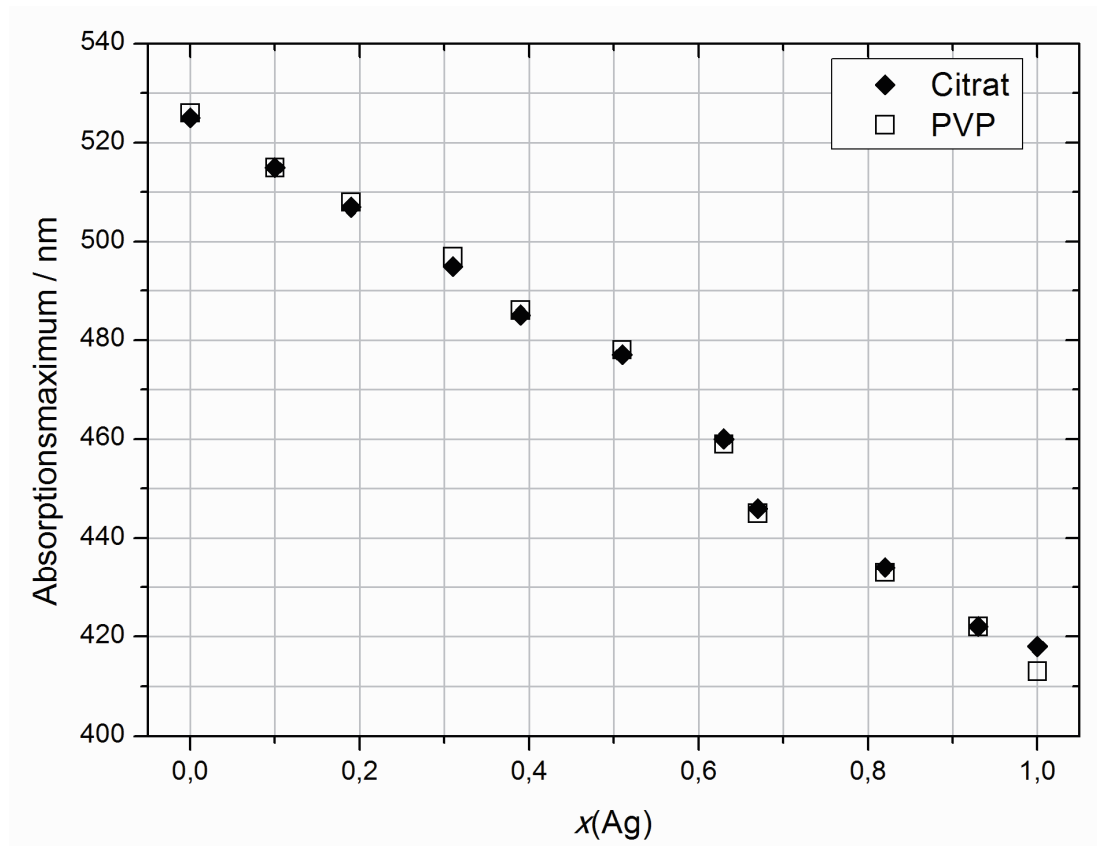


**Abbildung 27: Normalisierte Absorptionsspektren von PVP-stabilisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln aus Citrat-Reduktion in neun unterschiedlichen Zusammensetzungen sowie von reinen Ag- und Au-Nanopartikeln.**

Die Auftragung der Maxima der mittels UV-Vis-Spektroskopie aufgezeichneten Plasmonenabsorptionsbanden von Ag:Au-Citrat und umfunktionalisierten Ag:Au-PVP-Nanopartikeln gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  ist in Abbildung 28 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die nur geringe Abweichung von einem linearen Zusammenhang zwischen den beiden aufgetragenen Größen nach Umfunktionalisierung erhalten bleibt. Eine leichte Verschiebung der Maxima von Ag:Au-PVP-NPs um etwa 1-2 nm kann als Hinweis auf eine erfolgte Adsorption des Liganden PVP gewertet werden, da ein Ligandenaustausch zu einer Veränderung des lokalen Brechungsindex oder der lokalen Dielektrizitätsumgebung zwischen Partikeloberfläche und Stabilisator führen kann. Dies führt zu



Inhomogenitäten im Feld und resultiert in einer Verschiebung im Maximum der Plasmonenresonanzbande.<sup>[160]</sup>



**Abbildung 28:** Auftragung der Maxima der Plasmonenabsorptionsbanden PVP-stablisierter Ag:Au-, Ag- und Au-Nanopartikel aus Citrat-Reduktion gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$ .

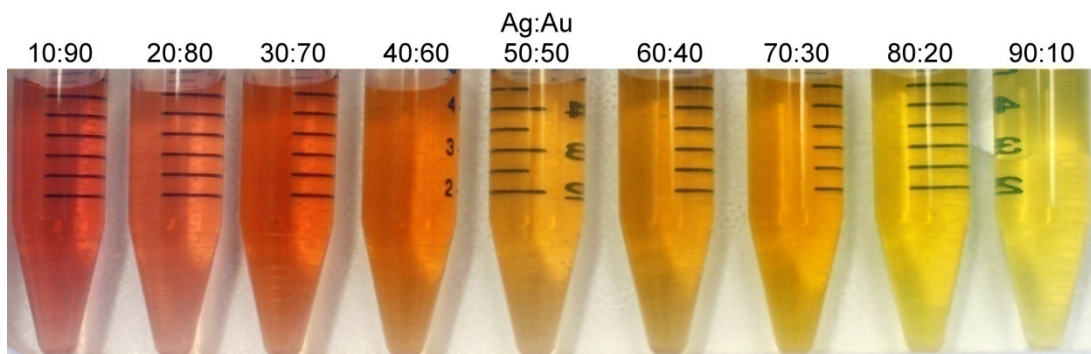
### 4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von Ag-Au-Nanopartikeln mit Citrat und der folgenden Umfunktionalisierung mit PVP

Mit der Übertragung der prominenten *Turkevich*-Methode zur Synthese von Goldnanopartikeln auf das Silber-Gold-System war es möglich, Citrat-stabilisierte bimetallische Ag-Au-Nanopartikel mit verschiedenen Zusammensetzungen zu synthetisieren. Die Co-Reduktion von  $\text{AuCl}_4^-$  und  $\text{Ag}^+$  in wässrigem Medium mit Trinatriumcitrat wurde in der Literatur für Ag-Au-Nanopartikel mit bestimmten Zusammensetzung bereits beschrieben.<sup>[129,140]</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Methode geeignet ist, sphärische Ag-Au-Nanopartikel in nahezu beliebiger Zusammensetzung darzustellen. Die synthetisierten Ag-Au-Nanopartikel wiesen hydrodynamische Durchmesser zwischen 33 nm und 65 nm auf, der Durchmesser der metallischen Kerne lag zwischen 13 nm und 33 nm. Damit lagen die Partikelgrößen der bimetallischen Nanopartikel zwischen den mit gleichen Reaktionsparametern dargestellten reinen Silber- und Gold-Partikeln. Es konnte mittels UV-Vis-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Nanopartikel einen hohen Legierungscharakter aufwiesen. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen in der Literatur beschriebenen Syntheserouten, die eine Co-Reduktion der Metalle Silber und Gold beschreiben.<sup>[118,129,161]</sup> Da die dargestellten Partikel eine geringe Langzeitstabilität aufwiesen und sich als anfällig gegenüber mehrfacher Ultrazentrifugation zwecks Aufreinigung zeigten, wurde ein Ligandenaustausch mit dem stabilisierenden Polymer PVP angestrebt. Durch DLS-, DCS- und Zetapotentialmessungen konnte gezeigt werden, dass die Umladung der Partikel erfolgreich durchgeführt wurde. Die elektrosterisch stabilisierten Ag:Au-PVP-Nanopartikel konnten durch Ultrazentrifugation von überschüssigen Reaktionsprodukten abgetrennt und charakterisiert werden. Es ergaben sich hydrodynamische Durchmesser zwischen 36 nm und 72 nm sowie Kerndurchmesser zwischen 12 nm und 32 nm. Da die dargestellten Nanopartikel zwar innerhalb einer bestimmten Zusammensetzung zumeist zufriedenstellende Monodispersität aufwiesen, die Partikelgrößen zwischen den unterschiedlichen Zusammensetzungen jedoch stark variierten und die

Stabilität der Partikel vor einem Ligandenaustausch nur gering war, wurden die mittels Citrat-Reduktion dargestellten Ag: Au-Citrat- und Ag: Au-PVP-Nanopartikel im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter verwendet.

#### 4.2.1 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit einem Gemisch aus tri-Natriumcitrat und Tannin

Da die Reduktion von  $\text{HAuCl}_4$  und  $\text{AgNO}_3$  mit tri-Natriumcitrat zwar eine Darstellung von legierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln ermöglichte, diese Partikel jedoch nur geringe Stabilität und zum Teil eine erhebliche Polydispersität aufwiesen, wurde eine weiterentwickelte Variante der *Turkevich*-Methode unter Verwendung eines Gemisches aus Trinatriumcitrat und Tannin als Reduktionsmittel zur Synthese der Ag-Au-Nanopartikel untersucht. Diese Modifikation verkürzte die Reaktionszeit von einer Stunde auf etwa fünf Minuten. Nach Zugabe des Reduktionsmittelgemisches erfolgte ein sofortiger Farbumschlag, der sich auch bei längerer Reaktionsdauer nicht mehr veränderte. In Abbildung 29 ist die Farbe der Reinmetalldispersionen, sowie der bimetallic Nanopartikeldispersionen in neun verschiedenen molaren Zusammensetzungen von Ag: Au-10:90 bis Ag: Au-90:10 nach Ablauf der Reaktionszeit und Abkühlen gezeigt.



**Abbildung 29: Farbeindruck von bimetallic Silber-Gold-Nanopartikeln mit Zusammensetzungen von Ag: Au-10:90 bis Ag: Au-90:10, synthetisiert mittels Citrat/Tannin-Reduktion.**

Die durch zweifache Ultrazentrifugation und Redispergieren in Reinstwasser aufgereinigten Citrat/Tannin-stabilisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung und analytischer Scheibenzentrifugation untersucht und mit den monometallic Nanopartikeln verglichen. Des Weiteren wurden

mittels UV-Vis Spektroskopie Absorptionsspektren der Plasmonenresonanz aufgezeichnet, um Aussagen über den Legierungscharakter der Partikel treffen zu können. Zur weiteren Charakterisierung wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mit REM und TEM angefertigt.

Um die Elementzusammensetzung der Nanopartikel zu bestimmen, wurden die Nanopartikelsysteme mittels AAS untersucht. Die analytisch ermittelten Zusammensetzungen (Tabelle 7) zeigen leichte Abweichungen von den theoretischen Werten, allerdings sind klare Unterscheidungen der unterschiedlichen Ag:Au-Partikelsysteme möglich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Nanopartikel im Folgenden ausschließlich mit ihrer theoretischen Zusammensetzung bezeichnet.

**Tabelle 7: Bestimmung der molaren Zusammensetzung der bimetalischen Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikel mittels AAS.**

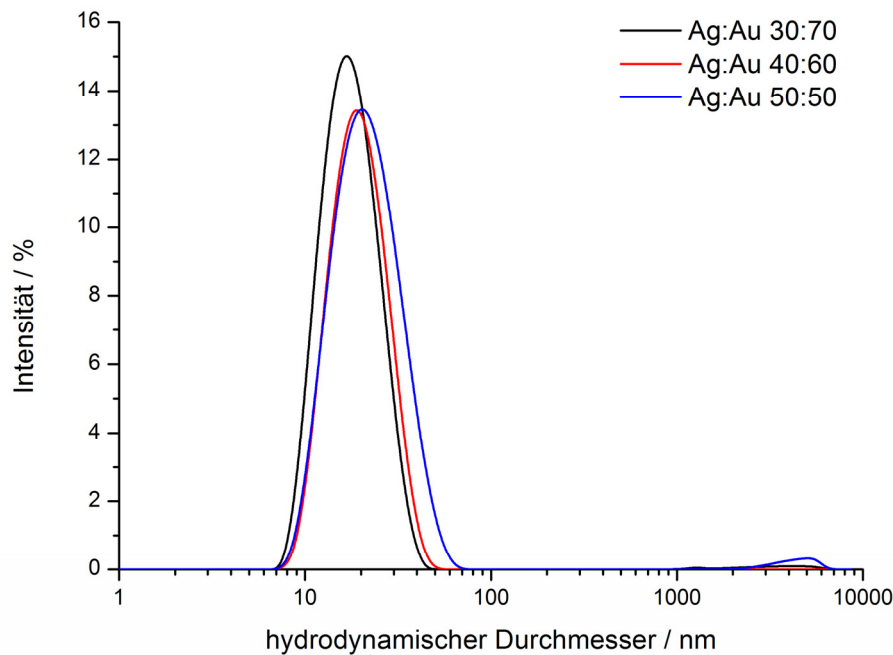
<b>Theoretische molare Ag:Au-Zusammensetzung</b>	<b>Molare Ag:Au-Zusammensetzung laut AAS</b>
10:90	11:89
20:80	20:80
30:70	33:67
40:60	43:57
50:50	51:49
60:40	63:37
70:30	73:27
80:20	81:19
90:10	92:8

Analysen zur Partikelgrößenverteilung der Citrat/Tannin-stabilisierten bimetalischen Ag-Au-Nanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung ergaben unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel weitestgehend monomodale Messkurvenverläufe und PDIs mit Werten kleiner als 0,3. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Metallsalze mit einer Mischung aus Citrat und Tannin zu monodisperseren Partikelsystemen führt als eine Reduktion mit Citrat allein. Auf Grund der gesteigerten Monodispersität und

der Monomodalität der Größenverteilungen entsprechen die im Folgenden angegebenen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser sowohl modalem Durchmesser, als auch *z-Average*.

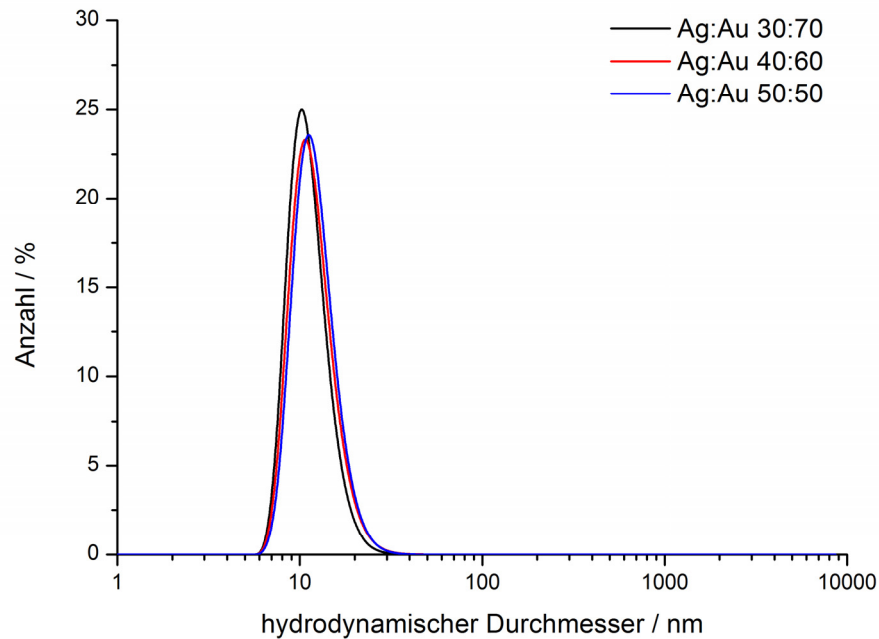
Die gemessenen Intensitätsverteilungen der Citrat/Tannin-Ag-Au-Nanopartikel ergaben hydrodynamische Durchmesser zwischen 15 nm und 37 nm. Die reinen Silber- und Gold-Partikel wiesen durchschnittliche hydrodynamische Partikeldurchmesser auf, die mit 9 nm (Au) und 43 nm (Ag) leicht unterhalb bzw. oberhalb der Legierungen mit dem höchsten Goldanteil bzw. Silberanteil lagen. Verglichen mit den mittels Citrat-Reduktion dargestellten Nanopartikeln, wurden in allen Fällen kleinere Partikeldurchmesser ermittelt. Besonders auffällig war ein deutlicher Größentrend in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel. So wiesen reine Gold-Nanopartikel mit 9 nm den kleinsten hydrodynamischen Durchmesser auf, für bimetallische Partikel mit Silberanteilen zwischen 10 mol% und 50 mol% ergaben sich ähnliche Durchmesser zwischen 15 nm und 18 nm, und für Partikel mit höheren Silberanteilen stieg der Durchmesser mit zunehmendem Silbergehalt an, bis hin zu den reinen Ag-Nanopartikeln mit dem größten Durchmesser.

In Abbildung 30 sind repräsentative intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln dargestellt. Die im Vergleich zur Citrat-Reduktion verbesserte Monodispersität ist trotz geringer Intensitäten im Bereich oberhalb von 1  $\mu\text{m}$  deutlich zu erkennen. Da die DLS-Messungen an aufgereinigten Proben durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei Intensitäten im Mikrometerbereich um vereinzelte sehr große Agglomerate handelt. Auf Grund der verbesserten Monodispersität und der damit verbundenen zuverlässigeren Messergebnisse der Lichtstreuung wurden die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung zwecks besserer Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls berücksichtigt.



**Abbildung 30: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln, gemessen mit DLS.**

In Abbildung 31 sind drei repräsentative Anzahlverteilungen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln gezeigt, die der Gewichtung entsprechend leicht verringerte durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser zwischen 11 nm und 12 nm ergaben. In den anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen wiederholte sich der Trend einer Größenzunahme der Nanopartikel mit steigendem Silberanteil für bimetallische Partikel ab einem Silbergehalt von über 50 mol%. Eine Zusammenstellung aller intensitätsgewichteten und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel wird in Tabelle 8 gegeben.



**Abbildung 31: Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln aus DLS-Messungen.**

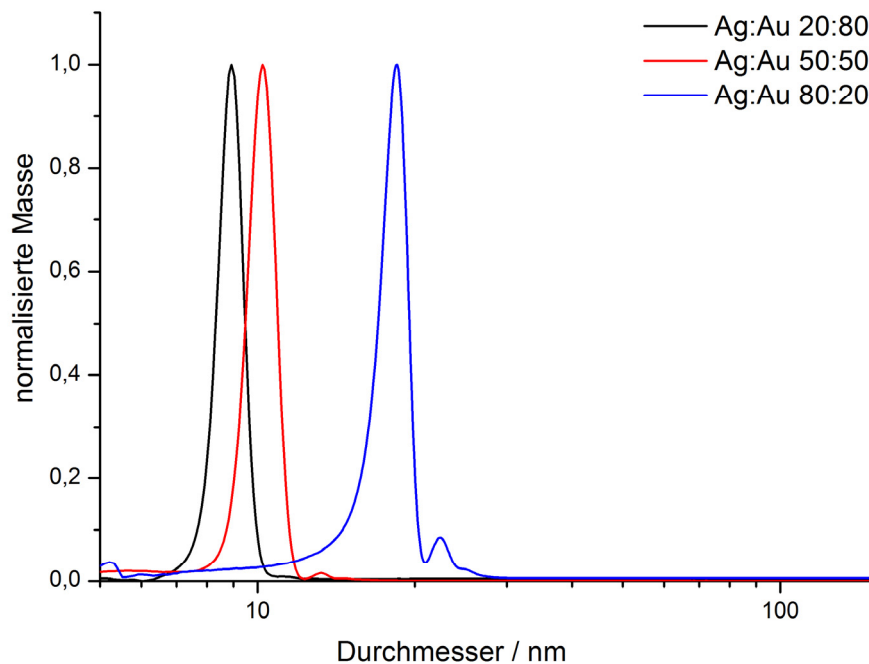
Messungen der elektrophoretischen Mobilität ergaben stark negative Zetapotentiale zwischen -28 mV und -64 mV, was auf eine ausreichende elektrostatische Stabilisierung der Partikel hindeutet. Da die Citrat-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikel ähnlich oder stärker negative Potentiale aufwiesen, ist anzunehmen, dass das zugegebene Tannin eine sterisch stabilisierende Komponente in das System bringt, welche zu erhöhter Stabilität der Nanopartikel und damit zu einer Möglichkeit zur Aufreinigung durch Zentrifugation führt. Die Zetapotentiale der Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag-Au-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat und Tannin als Reduktionsmittel.**

Ag:Au / mol%:mol%	$D_h$ nach Intensität (DLS) / nm	$D_h$ nach Anzahl (DLS) / nm	PDI	Zetapotential / mV
0:100	9	7	0,124	-41
10:90	16	12	0,273	-64
20:80	15	12	0,260	-50
30:70	16	11	0,203	-34
40:60	17	12	0,221	-36
50:50	18	12	0,171	-28
60:40	21	12	0,231	-35
70:30	25	15	0,184	-39
80:20	35	18	0,216	-42
90:10	37	19	0,195	-42
100:0	43	25	0,160	-40

Partikelgrößenanalysen mittels analytischer Scheibenzentrifugation ergaben nahezu monomodale massegewichtete Verteilungskurven, aus denen durchschnittliche Partikeldurchmesser zwischen 9 nm und 23 nm ermittelt wurden. Während die reinen Goldpartikel mit 9 nm eine vergleichbare Partikelgröße aufwiesen wie bimetallische Ag:Au-10:90- bis Ag:Au-40:60-Nanopartikel, ergaben sich ab einer Zusammensetzung von Ag:Au-50:50 mit steigendem Silberanteil analog zu den DLS-Messungen zunehmende Partikeldurchmesser bis hin zu 28 nm für reine Silbernanopartikel. In Abbildung 32 sind drei repräsentative massegewichtete Partikelgrößenverteilungen dargestellt, auf denen der Größenunterschied zwischen Citrat/Tannin-Ag-Au-Nanopartikeln mit hohem Goldanteil und solchen mit hohem Silberanteil deutlich wird. Die im Vergleich zu den Citrat-stabilisierten Nanopartikeln wesentlich schmalere Größenverteilungskurve zeigt die verbesserte Monodispersität der Citrat/Tannin-Ag-Au-Nanopartikel an. In einigen Messungen wurde jedoch auch eine gewisse Anzahl an Nanopartikeln mit geringfügig größerem Durchmesser detektiert (Abbildung 32, Ag:Au-80:20, blaue Kurve).





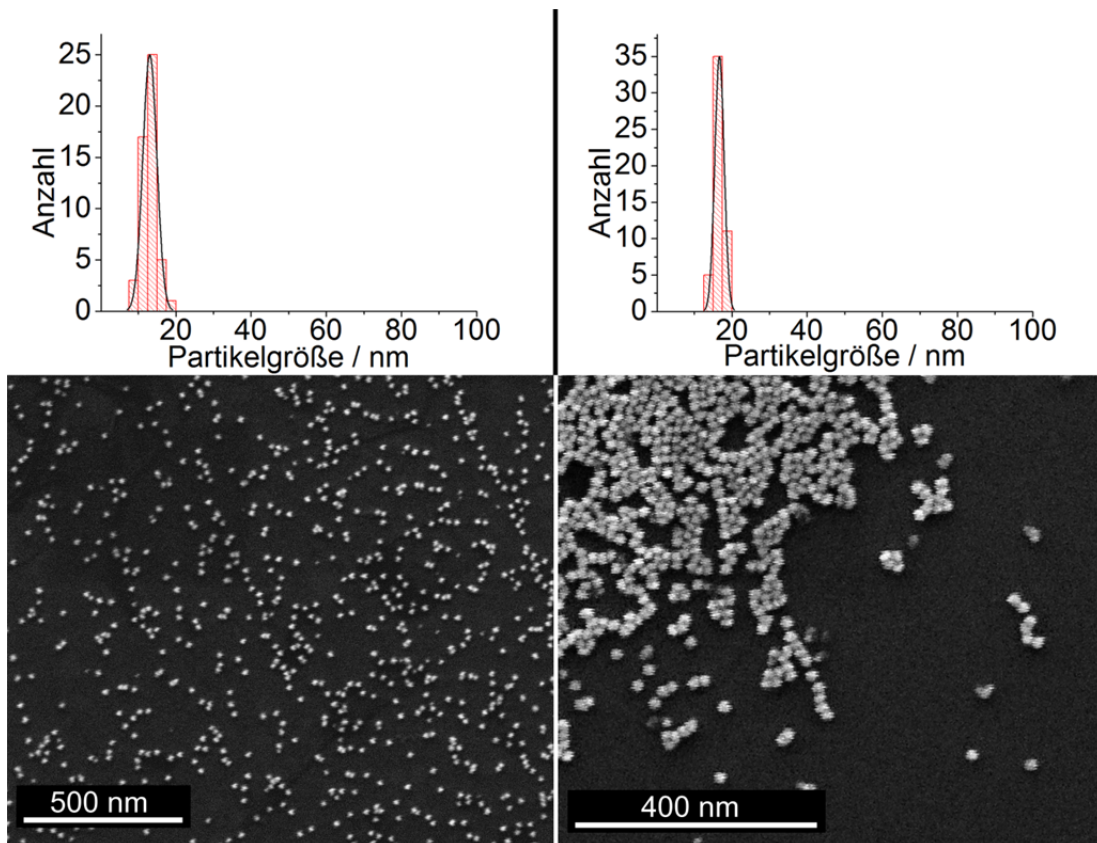
**Abbildung 32: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-20:80-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln.**

Die detektierten Signale rühren von einzelnen, geringfügig größeren Nanopartikeln oder sehr kleinen Agglomeraten aus nur wenigen Partikeln her. Größere Agglomerate im Bereich von 50 - 150 nm wurden nicht detektiert. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden aus den massegewichteten Durchmessern anzahlgewichtete Partikelgrößen errechnet. In Tabelle 9 sind alle mittels DCS ermittelten masse- und anzahlgewichteten Partikelgrößen der Citrat/Tannin-Ag:Au-, Ag- und Au-Nanopartikel dargestellt. Eine Gegenüberstellung mit den Anzahlverteilungen aus DLS-Messungen zeigt vergleichbare Partikelgrößen. Partikel mit höheren Goldanteilen weisen in der DCS einen leicht verringerten, solche mit höheren Silberanteilen einen leicht vergrößerten durchschnittlichen Partikeldurchmesser auf. Da es sich bei den anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen um mathematische Umformungen handelt, die, abhängig von der Qualität der ursprünglichen Größenverteilungen, anfällig für Fehler sein können, kann man von relativ guter Übereinstimmung der Messergebnisse sprechen.

**Tabelle 9: Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche massegewichtete Partikeldurchmesser Citrat/Tannin-stabilsierter Ag-Au-Nanopartikel und Reinmetallpartikel, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser und aus REM-Bildern ermittelte Durchmesser.**

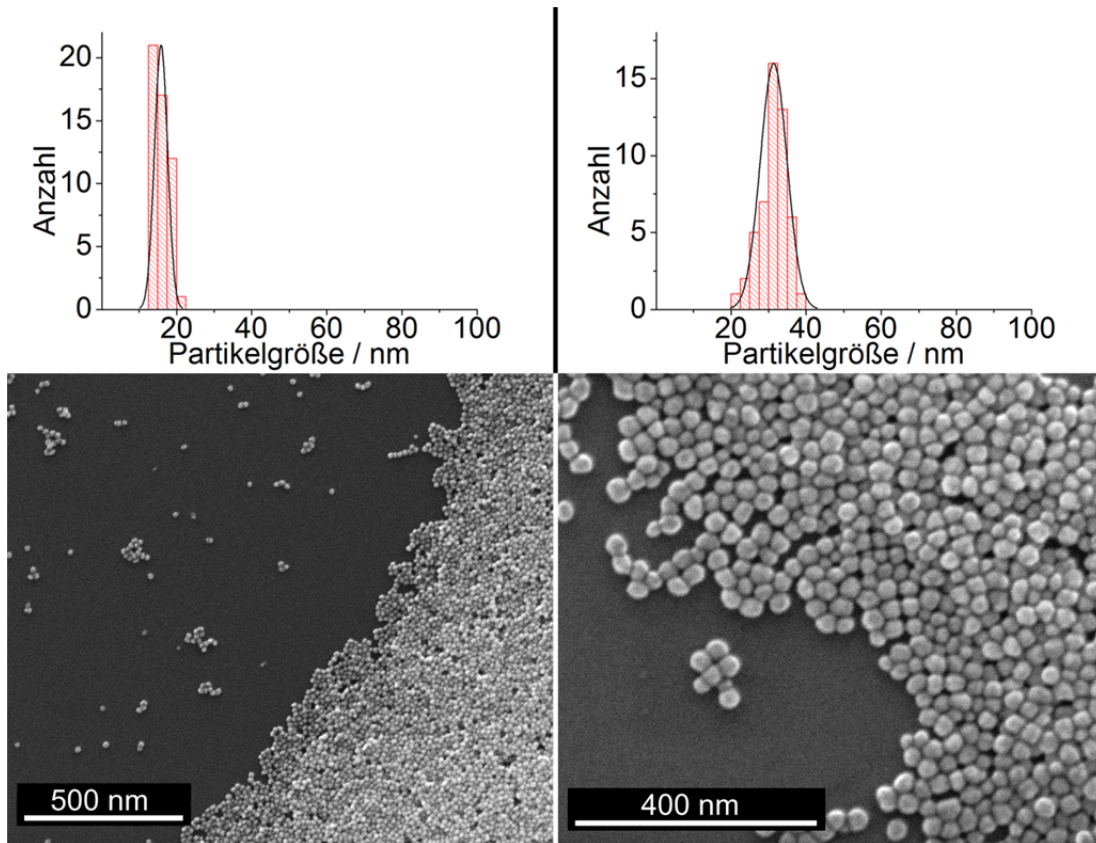
Ag:Au / mol%:mol%	D nach Masse (DCS) / nm	D nach Anzahl (DCS) / nm	D nach Anzahl (REM) / nm
0:100	9,5	9,1	9±1
10:90	9,5	8,7	9±2
20:80	9,2	8,8	9±1
30:70	9,6	9,1	10±2
40:60	9,1	8,6	10±1
50:50	10	9,9	11±1
60:40	12	12	14±2
70:30	18	14	14±2
80:20	19	18	18±2
90:10	23	23	23±3
100:0	28	27	31±3

REM-Aufnahmen der Citrat/Tannin-Ag-Au-Nanopartikel zeigen eine ausschließlich sphärische Morphologie und belegen die Monodispersität der dargestellten bimetallischen Partikel. Zur Untersuchung der durchschnittlichen Partikelgröße wurden 100 Partikel manuell vermessen und der modale Durchmesser der Normalverteilung des erstellten Histogramms betrachtet. Auf den REM-Aufnahmen wird der zusammensetzungsabhängige Partikelgrößenunterschied deutlich. In Abbildung 33 sind zwei exemplarische REM-Aufnahmen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70- und Ag:Au-60:40-Nanopartikeln dargestellt. Die Durchmesser der Partikel liegen mit 10 nm (30:70) und 14 nm (60:40) um etwa 1 nm bzw. 2 nm über den aus Anzahlverteilungen der DCS errechneten durchschnittlichen Partikeldurchmessern.



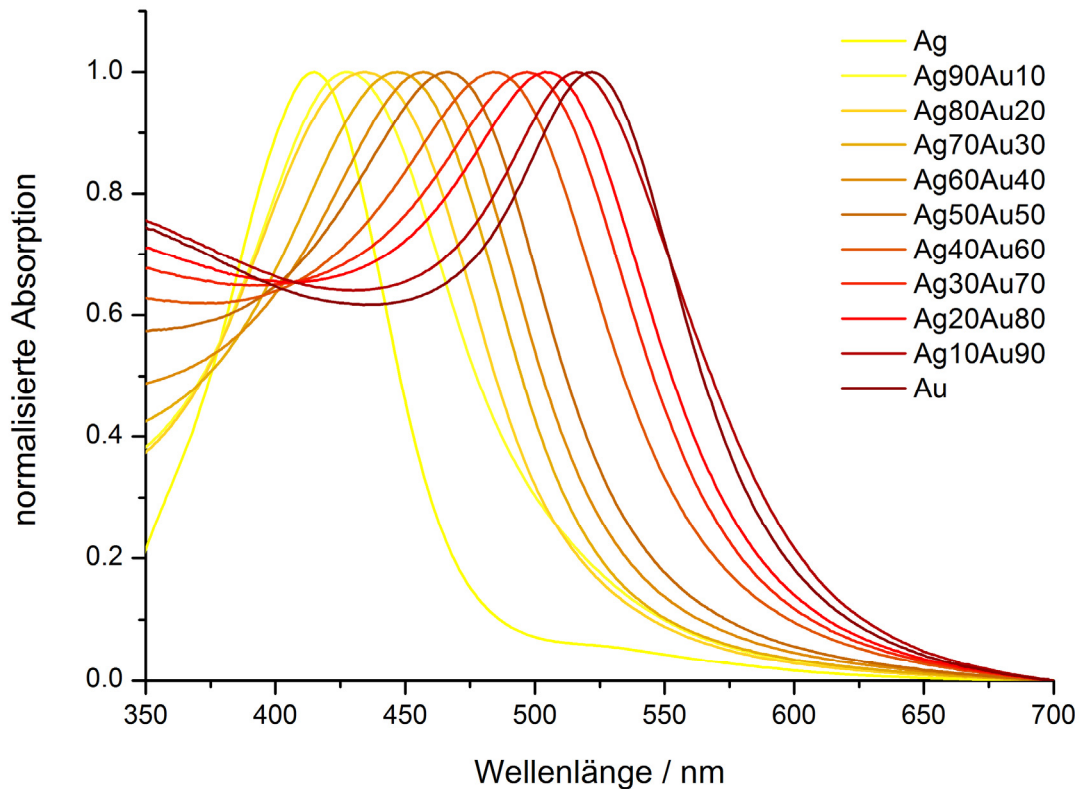
**Abbildung 33: REM-Aufnahmen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-30:70-Nanopartikeln,  $d = 10$  nm (links) und Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-60:40-Nanopartikeln,  $d = 14$  nm (rechts).**

Abbildung 33 zeigt zwei repräsentative REM-Aufnahmen von sphärischen Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-80:20- und Ag-Nanopartikeln mit Durchmessern von 18 nm (80:20) und 31 nm (Ag). Die aus den REM-Aufnahmen errechneten Durchmesser gleichen im Fall der Ag:Au-80:20-Nanopartikel dem aus Anzahlverteilungen der DCS errechneten durchschnittlichen Partikeldurchmesser, die reinen Silbernanopartikel liegen etwa 4 nm darüber. Da mit der Elektronenmikroskopie typischerweise nur ein sehr geringer Teil der Probe abgedeckt wird, sind leichte Abweichungen zwischen REM, DCS und DLS zu erwarten. Die Messergebnisse der drei unterschiedlichen Methoden stimmen somit relativ gut überein.



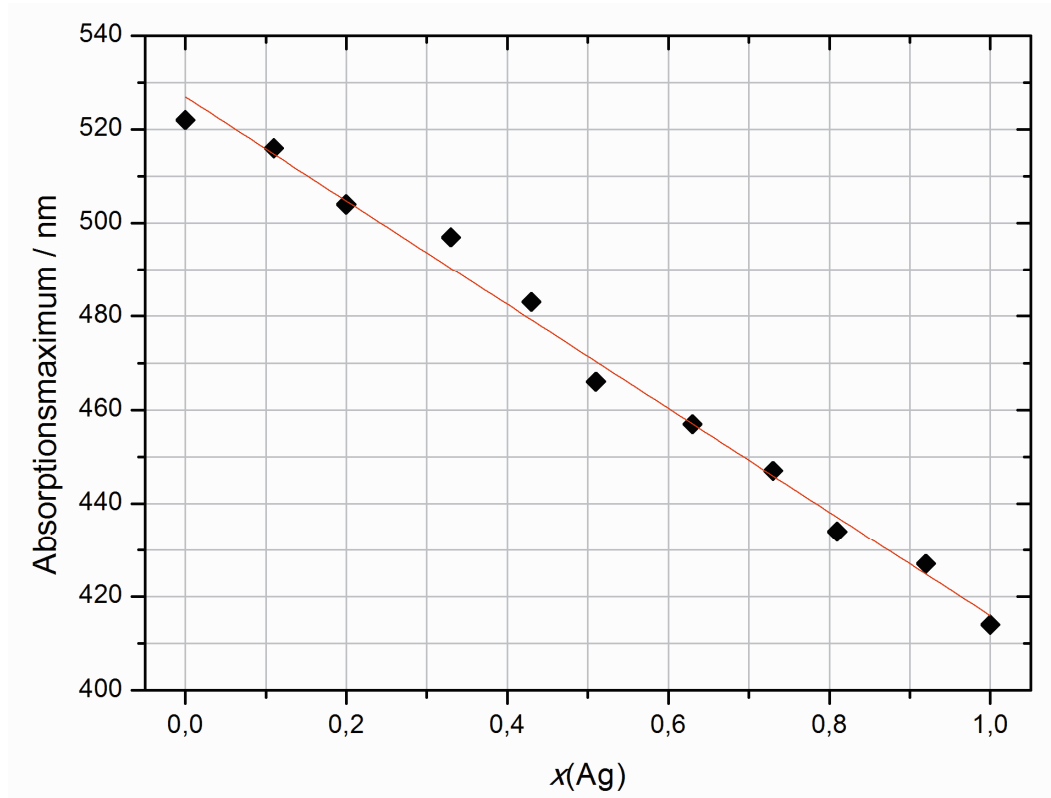
**Abbildung 34:** REM-Aufnahmen von Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Ag-80:20-Nanopartikeln,  $d = 18$  nm (links) und Citrat/Tannin-stabilisierten Ag-Nanopartikeln,  $d = 31$  nm (rechts).

Die über Citrat/Tannin-Reduktion dargestellten Ag-Au-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihrer inneren Struktur mittels UV-Vis-Spektroskopie untersucht. Die gemessenen Absorptionsspektren wiesen unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel nur ein schmales Maximum auf, was darauf schließen lässt, dass die innere Struktur der Partikel hohen Legierungscharakter hat.



**Abbildung 35: Normalisierte Absorptionsspektren von Citrat/Tannin-stabilisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln in neun unterschiedlichen Zusammensetzungen und reinen Ag- und Au-Nanopartikeln.**

In Abbildung 35 sind die Plasmonen-absorptionsspektren der bimetallic Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel und der reinen Ag- und Au-Nanopartikel dargestellt. Im Falle einer statistischen Legierung wäre von reinen Goldnanopartikeln ausgehend ein linearer Blau-shift des Absorptionsmaximums der bimetallic Nanopartikel mit steigendem Silberanteil zu erwarten. Eine Auftragung der Absorptionsmaxima der in Abbildung 35 gezeigten Plasmonen-absorptionsspektren gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  ist in Abbildung 36 dargestellt. Ein berechneter linearer Fit zeigt leichte Abweichungen der Absorptionsmaxima vom idealen linearen Zusammenhang mit dem Molenbruch.



**Abbildung 36:** Auftragung der Maxima der Plasmonenabsorptionsbanden Citrat/Tannin-stabiler Ag:Ag-Au-, Ag- und Au-Nanopartikel gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  mit berechnetem linearen Fit.

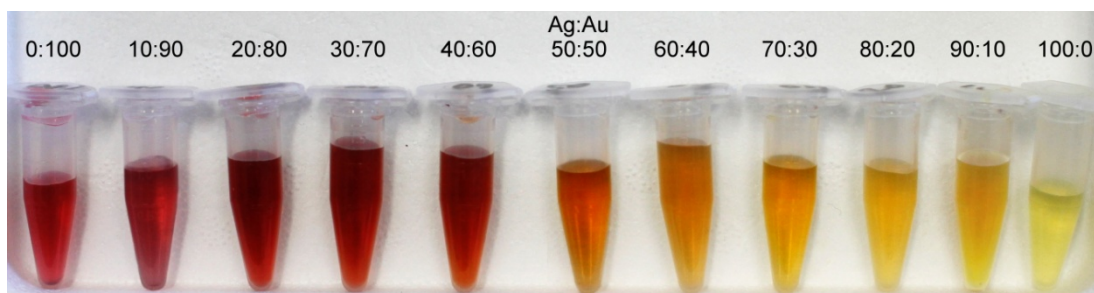
Auf Grund des Größenunterschieds zwischen bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln mit hohem Silberanteil und solchen mit hohem Goldanteil, der die Lage des Absorptionsmaximums beeinflusst, wäre eine leichte Abweichung der Datenpunkte mit  $x(\text{Ag}) > 0,6$  vom Fit in Richtung höherer Wellenlängen zu erwarten gewesen. Auf Grund der leichten Streuung der Messwerte, ist dieser Trend jedoch nicht zu beobachten. Die Abweichung der Datenpunkte vom idealen linearen Zusammenhang ist allerdings insgesamt gering, daher ist davon auszugehen, dass die Verteilung der Elemente innerhalb der Partikel nah an einer statistischen Legierung liegt und kaum Auftrennung der Metalle vorliegt.<sup>[121,144,162]</sup>

#### 4.2.2 Umfunktionalisierung mit PVP und TPPTS

Um eine erhöhte Stabilität durch Einbringen eines sterisch anspruchsvollen Liganden zu erzielen, wurden die Citrat/Tannin-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel analog zu den Citrat-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln mit PVP umfunktionalisiert. Nach dem Aufbringen von PVP konnten die Partikel



mittels Ultrazentrifugation vom überschüssigen Polymer und verbleibenden Reaktionsprodukten abgetrennt und in Reinstwasser redispergiert werden. In Abbildung 37 ist die Farbe der Reinmetalldispersionen sowie der bimetalischen Nanopartikeldispersionen in neun verschiedenen molaren Zusammensetzungen von Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-90:10 nach Umfunktionalisierung mit PVP gezeigt.



**Abbildung 37: Farbe von PVP-funktionalisierten Silber-, Gold- und bimetalischen Silber-Gold-Nanopartikeln mit Zusammensetzungen von Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-90:10.**

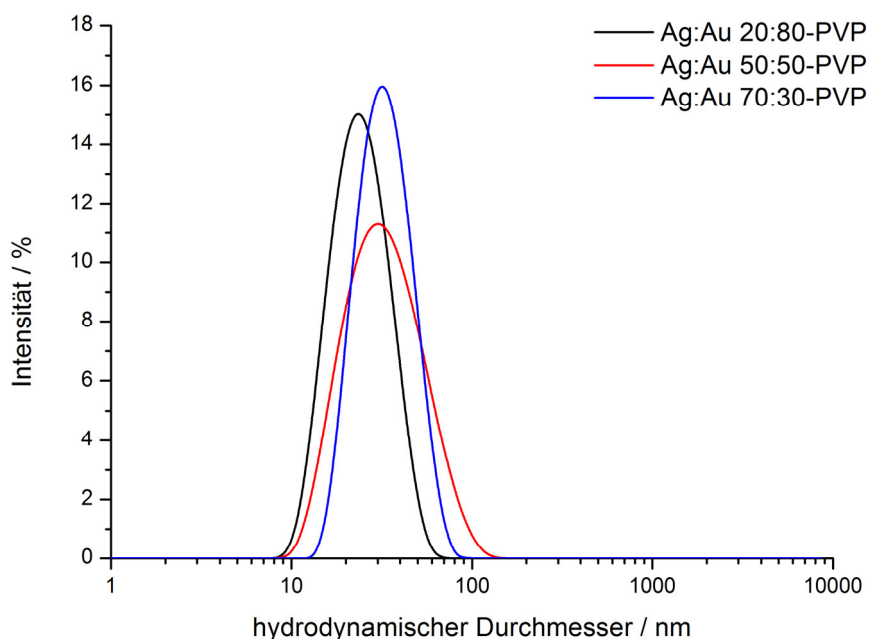
Des Weiteren wurde eine Umfunktionalisierung der Citrat/Tannin-Ag-Au-Nanopartikel mit dem im Vergleich zu Trinatriumcitrat auf Grund der zentralen Phenylgruppen leicht unpolareren Phosphanliganden TPPTS (Tri-(natrium-*m*-sulfatophenyl)-phosphan), einem häufig zur Stabilisierung von Gold-Nanopartikeln verwendeten Liganden, untersucht. Nach dem Aufbringen von TPPTS konnten die Partikel mittels Ultrazentrifugation vom überschüssigen Polymer und verbleibenden Reaktionsprodukten abgetrennt und in Reinstwasser redispergiert werden.

Die umfunktionalisierten Nanopartikel wurden hinsichtlich der hydrodynamischen Partikelgröße und der elektrophoretischen Mobilität mittels DLS untersucht. Zudem wurde die Partikelgröße aus DCS-Messungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelt. Die innere Struktur wurde mit Hilfe von UV-Vis-Spektroskopie untersucht, während die tatsächliche Zusammensetzung der umfunktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel mittels AAS sowie im Falle der Ag:Au-50:50-PVP und -TPPTS-Nanopartikel auch durch STEM- und HAADF-Messungen ermittelt wurde.

Die hydrodynamischen Durchmesser der polymerstabilisierten Ag:Au-PVP-Nanopartikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert und lagen

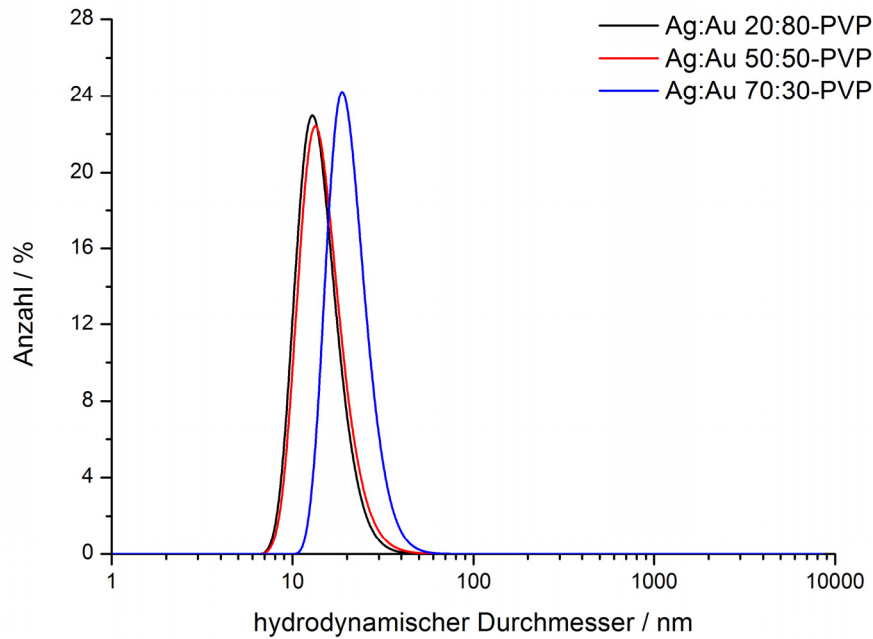
zwischen 27 nm und 64 nm (Intensität) bzw. 14 nm und 35 nm (Anzahl) und damit zwischen 5 nm und 18 nm (Intensität) bzw. 2 nm und 16 nm (Anzahl) über den gemessenen Durchmessern der Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel. Dabei ist auffällig, dass der maximale Größenunterschied jeweils bei Ag:Au-10:90-Nanopartikeln zu beobachten war und besonders in der Anzahlverteilung weit über dem Durchschnitt der übrigen Nanopartikel von etwa 4 nm liegt. Der hydrodynamische Durchmesser der reinen Gold-Nanopartikel wies mit 33 nm (Intensität) bzw. 13 nm (Anzahl) einen ähnlichen Wert wie Ag:Au-PVP-Nanopartikel mit hohen Goldanteilen auf, während die reinen Silberpartikeln mit 67 nm (Intensität) bzw. 37 nm (Anzahl) den größten hydrodynamischen Durchmesser aufwiesen. Alle aufgenommenen Größenverteilungskurven der Ag:Au-PVP-Nanopartikel zeigten einen monomodalen Verlauf und eine geringe Breite, was sich mit den ermittelten PDIs von  $< 0,3$  deckt und auf eine hinreichende Monodispersität hindeutet. Der modale hydrodynamische Durchmesser der Ag:Au-PVP-Nanopartikel entsprach jeweils dem ermittelten *z-Average*. Die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers von Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikeln zu Ag:Au-PVP-Nanopartikeln spricht für eine erfolgreiche Funktionalisierung mit PVP. Die monomodale Größenverteilung deutet eine effektive Abtrennung der Nanopartikel von überschüssigen Reaktionsprodukten wie z.B. freien Polymermolekülen an. In Abbildung 38 ist der Vergleich der intensitätsgewichteten Partikel-größenverteilung von PVP-stabilisierten Ag:Au-20:80-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-70:30-Nanopartikeln dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der schon vor der Umfunktionalisierung sichtbare Größentrend mit zunehmendem Durchmesser bei steigendem Silberanteil der Nanopartikel. Diese Größenzunahme ist nach Umfunktionalisierung stärker ausgeprägt, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass auf größeren Partikeln eine erhöhte Menge Polymer adsorbiert wurde, welches im hydratisierten und gequollenen Zustand einen stärkeren Größenunterschied bewirkt.





**Abbildung 38: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-20:80-, Ag:Ag-50:50- und Ag:Ag-70:30-Nanopartikeln aus DLS-Messungen.**

Auf Grund der gegebenen Monodispersität der Ag:Ag-PVP-Nanopartikel und den damit verbundenen zuverlässigen Messergebnisse der Lichtstreuung wurden die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen zwecks besserer Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen ebenfalls berücksichtigt. In Abbildung 39 sind drei repräsentative Anzahlverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-20:80-, Ag:Ag-50:50- und Ag:Ag-70:30-Nanopartikeln gezeigt, die der Gewichtung entsprechend leicht verringerte durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser zwischen 13 nm und 35 nm ergaben. Eine Zusammenstellung aller intensitätsgewichteten und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der PVP-stabilisierten Nanopartikel ist in Tabelle 10 aufgeführt.



**Abbildung 39: Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Au-20:80-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-70:30-Nanopartikeln aus DLS-Messungen.**

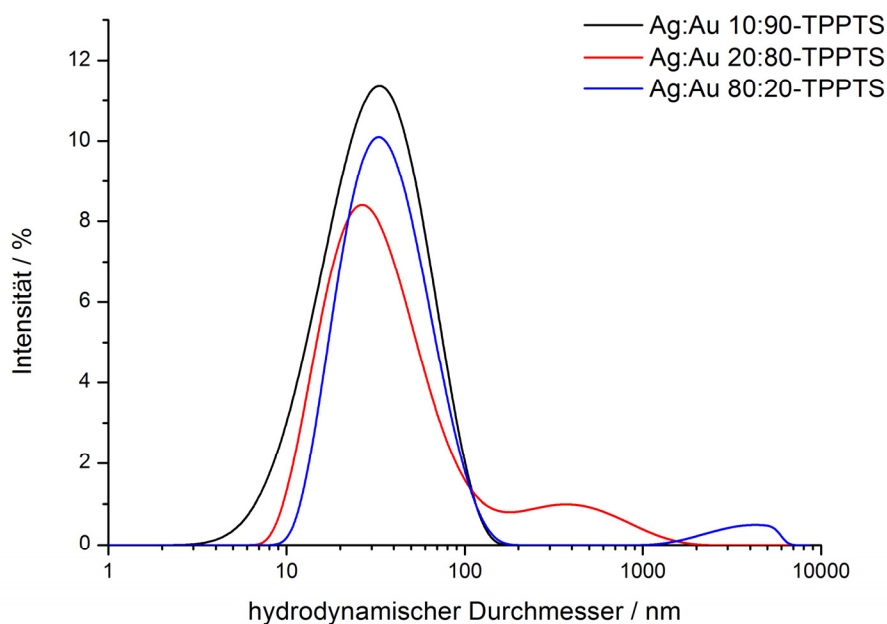
Messungen der elektrophoretischen Mobilität ergaben stark negative Zetapotentiale zwischen -25 mV und -50 mV, was darauf hindeutet, dass trotz der Adsorption von PVP noch Reste von Citrat- oder Gerbsäuremolekülen bzw. deren Reaktionsprodukte oder Fragmente um die Partikel angelagert sind. Dies würde neben der sterischen Stabilisierung durch das Polymer weiterhin für elektrostatische Abschirmung sorgen und die Stabilität des nanopartikulären Systems vergrößern. Die Zetapotentiale der PVP-stabilisierten Nanopartikel sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag:Au-PVP-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat und Tannin als Reduktionsmittel**

Ag:Au / mol%:mol%	$D_h$ nach Intensität (DLS) / nm	$D_h$ nach Anzahl (DLS) / nm	PDI	Zetapotential / mV
0:100	33	13	0,262	-38
10:90	34	14	0,236	-42
20:80	27	14	0,135	-42
30:70	38	18	0,186	-38
40:60	27	14	0,234	-34
50:50	29	14	0,231	-49
60:40	28	15	0,163	-41
70:30	30	20	0,143	-25
80:20	35	24	0,183	-48
90:10	64	35	0,277	-50
100:0	67	37	0,261	-49

Die DLS-Messungen an aufgereinigten Phosphan-stabilisierten Ag:Au-TPPTS-Nanopartikel zeigten bei vielen Nanopartikelsystemen eine deutlich erhöhte Polydispersität. Nur Ag:Au-10:90-TPPTS-, Ag:Au-40:60-TPPTS- und Ag:Au-80:20-TPPTS- sowie die reinen Ag- und Au-Nanopartikel lagen mit dem Polydispersitätsindex unterhalb von 0,3. Die ermittelten hydrodynamischen Durchmesser dieser Partikelsysteme lagen zwischen 33 nm und 40 nm (Intensität) und damit zwischen 1 nm und 29 nm (Intensität) über den gemessenen Durchmessern der Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikel. Die übrigen Ag:Au-TPPTS-Systeme wiesen auf Grund der Polydispersität einen relativ großen *z-Average* auf, weshalb im Folgenden die modalen Durchmesser der Mode mit der höchsten Intensität angegeben werden. Auch hinsichtlich der modalen Durchmesser war eine Größenzunahme nach Funktionalisierung der Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikel mit TPPTS zu verzeichnen, die jedoch bezüglich der Differenz zwischen Partikeln vor und nach der Umfunktionalisierung völlig zufällig erscheint. Ag:Au-20:80-TPPTS-Nanopartikel zeigten sogar einen verringerten Durchmesser nach Ligandenaustausch. Die aufgenommenen Größenverteilungskurven der Ag:Au-TPPTS-Nanopartikel mit einem

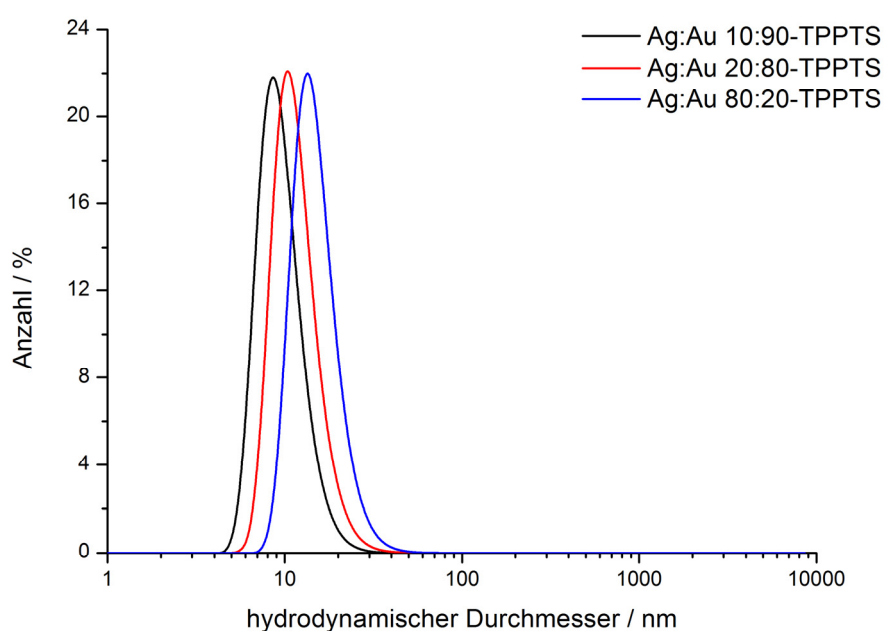
PDI < 0,3 zeigten einen monomodalen oder bimodalen Verlauf, während die restlichen Größenverteilungskurven zumeist mehr als zwei Moden aufwiesen. In Abbildung 40 sind repräsentative intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von TPPTS-stabilisierten Ag:Au-10:90-, Ag:Au-20:80- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln dargestellt. Zu erkennen ist der scheinbar zufällige Größentrend und die bimodale Verteilung der Ag:Au-20:80-TPPTS- und Ag:Au-80:20-TPPTS-Nanopartikel. Die Verläufe der Größenverteilungskurven und die hohe Polydispersität aller Partikelsysteme deuten auf Agglomeration der TPPTS-stabilisierten Nanopartikel hin.



**Abbildung 40: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von TPPTS-stabilisierten Ag:Au-10:90-, Ag:Au-20:80- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln, gemessen mit DLS.**

Trotz der teilweise hohen Polydispersität und multimodaler Partikelgrößenverteilungskurven wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit der Partikelsysteme mit einem PDI < 0,3 die Anzahlverteilungen ermittelt. Es ist zu beachten, dass die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen für polydisperse Partikelsysteme auf Grund der rein mathematischen Umformung mit großen Fehlern behaftet sein können und zu potentiell unrealistischen durchschnittlichen hydrodynamischen Partikelgrößen führen könnte. In Abbildung 41 sind die Anzahlverteilungen der weitestgehend monodispersen TPPTS-stabilisierten Ag:Au-10:90- und Ag:Au-80:20-

Nanopartikeln sowie von Ag:Au-20:80-Nanopartikeln mit einem PDI von 0,390 gezeigt. Der Gewichtung entsprechend ergeben sich leicht verringerte durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser zwischen 10 nm und 15 nm. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel. Jedoch ergaben einige anzahlgewichtete Größenverteilungen auch durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser von 2 - 3 nm (Ag:Au-60:40, Ag:Au-70:30, Ag:Au-90:10), was darauf hindeutet, dass die Umrechnung auf Grund hoher Polydispersität fehlerhafte Ergebnisse lieferte.



**Abbildung 41: Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen von TPPTS-stabilisierten Ag:Au-10:90-, Ag:Au-20:80- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln aus DLS-Messungen.**

Eine Zusammenfassung aller intensitätsgewichteter und daraus berechneter anzahlgewichteter Partikelgrößenverteilungen der TPPTS-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel sowie die der reinen Ag- und Au-Nanopartikel ist in Tabelle 11 gezeigt. Messungen der elektrophoretischen Mobilität ergaben stark negative Zetapotentialwerte zwischen -31 mV und -59 mV. Die reinen Ag-TPPTS- und Au-TPPTS-Nanopartikel zeigten ähnlich negative Potentiale. Diese Beobachtung deckt sich mit Beobachtungen, die für eine Umfunktionalisierung von Au-Citrat-Nanopartikeln mit TPPTS durchgeführt wurden.<sup>[77,155]</sup> Interessanterweise ist im Fall einer Phosphan-Stabilisierung

das stark negative Potential der Partikel nicht ausreichend, um eine Agglomeration zu verhindern. Da eine sterisch stabilisierende Komponente durch das eher kleine TPPTS-Molekül vernachlässigt werden kann, ähnelt das System bezüglich der Stabilität den Citrat-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln, die sich trotz negativen Zetapotentials als nicht zentrifugierbar und langzeitstabil erwiesen. Auf Grund der Tatsache, dass nach TPPTS-Adsorption eine Aufreinigung der Partikelsysteme durch Ultrazentrifugation möglich war, ist die Stabilität des TPPTS-Nanopartikelsystems dennoch als höher einzuschätzen als die des Citrat-Nanopartikelsystems.

**Tabelle 11: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat und Tannin als Reduktionsmittel.**

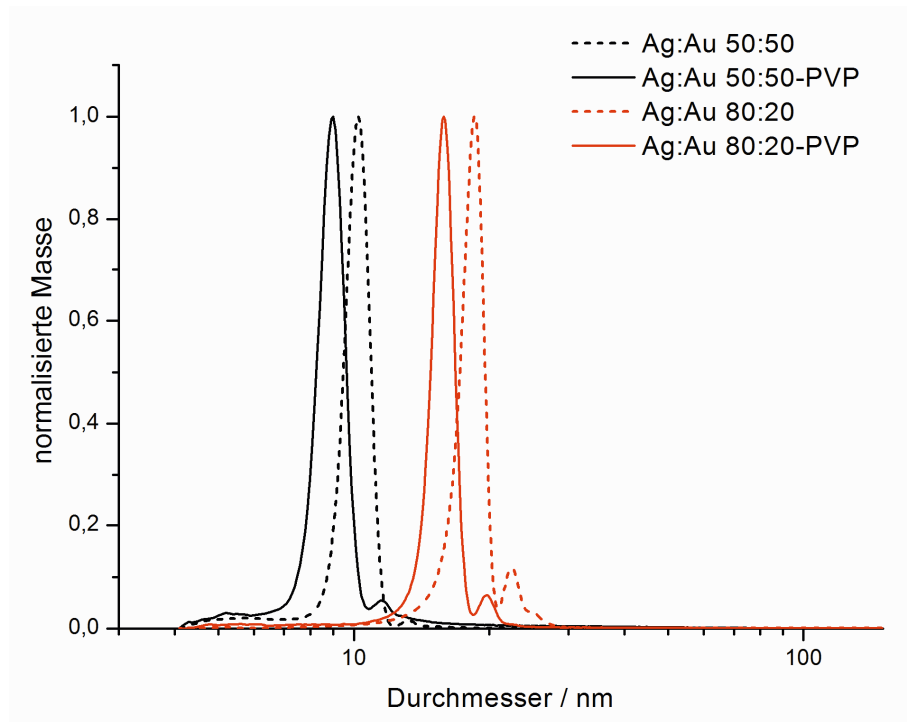
Ag:Au / mol%:mol%	$D_h$ nach Intensität (DLS) / nm	$D_h$ nach Anzahl (DLS) / nm	PDI	Zetapotential / mV
0:100	38	14	0,209	-52
10:90	33	10	0,282	-54
20:80	28	12	0,390	-31
30:70	38	13	0,311	-57
40:60	40	14	0,288	-39
50:50	39	14	0,327	-53
60:40	39	3 <sup>(*)</sup>	0,430	-59
70:30	35	3 <sup>(*)</sup>	0,413	-50
80:20	36	15	0,266	-56
90:10	68	2 <sup>(*)</sup>	0,575	-54
100:0	79	35	0,273	-55

(\*) Errechnete Partikelgrößen nach Anzahl auf Grund des hohen PDI fehlerhaft

Eine Zusammenfassung der ermittelten Zetapotentiale für Ag:Au-TPPTS-Nanopartikel in neun verschiedenen Zusammensetzungen sowie die der reinen Ag- und Au-Nanopartikel ist in Tabelle 11 aufgeführt.

Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung PVP-funktionalisierter Ag-Au-Nanopartikel mittels DCS zeigten weitgehend monomodale Verteilungen, die in einigen Fällen eine kleine Schulter im Bereich unterhalb der doppelten durchschnittlichen Partikelgröße aufwiesen. Diese kleinen Signale deuten auf Anwesenheit von wenigen größeren Partikeln oder kleinen Agglomeraten aus

wenigen Partikeln hin. Ein Vergleich zwischen PVP- und Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikeln ergab verringerte durchschnittliche Partikeldurchmesser für polymerfunktionalisierte Nanopartikel. Für PVP-stabilisierte Ag:Au-50:50-Nanopartikel wurde z.B. vor der Umfunktionalisierung ein durchschnittlicher Durchmesser von 10 nm aus der massengewichteten Partikelgrößenverteilung ermittelt, nach der Umfunktionalisierung betrug der Durchmesser 9,0 nm. Bei Ag:Au-80:20-Nanopartikeln verringerte sich der Durchmesser von 19 nm nach der PVP-Funktionalisierung auf 16 nm. Diese scheinbare Verringerung des durchschnittlichen Durchmessers zeigt, analog zu der Umfunktionalisierung von Ag:Au-Citrat-Nanopartikeln mit PVP, eine erfolgreiche Polymerbeladung der Partikel an. Die vor der Adsorption von PVP ersichtliche Partikelgrößenzunahme für Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikel mit hohem Silberanteil blieb auch nach der PVP-Stabilisierung erhalten. In Abbildung 42 sind zwei repräsentative massengewichtete Partikelgrößenverteilungen von bimetallicischen Nanopartikeln mit unterschiedlichen Zusammensetzungen vor und nach der Umfunktionalisierung gezeigt, die die scheinbare Verkleinerung der polymerstabilisierten Nanopartikel verdeutlichen.



**Abbildung 42: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an Citrat/Tannin-stabilisierten Ag:Au-50:50- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln vor (gestrichelte Linie) und nach (durchgezogene Linie) der Umfunktionalisierung mit PVP**

Die aus massegewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelten durchschnittlichen Durchmesser der PVP-funktionalisierten Ag:Au-Nanopartikel sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die Größendifferenz der Partikel zu den Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikeln betrug zwischen 0,1 nm und 5 nm. Die Au-PVP-Nanopartikel hatten einen 0,5 nm größeren Durchmesser. Aus den massegewichteten Größenverteilungen wurden zwecks Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzahlgewichtete Verteilungen errechnet, die ebenfalls in Tabelle 12 dargestellt werden.



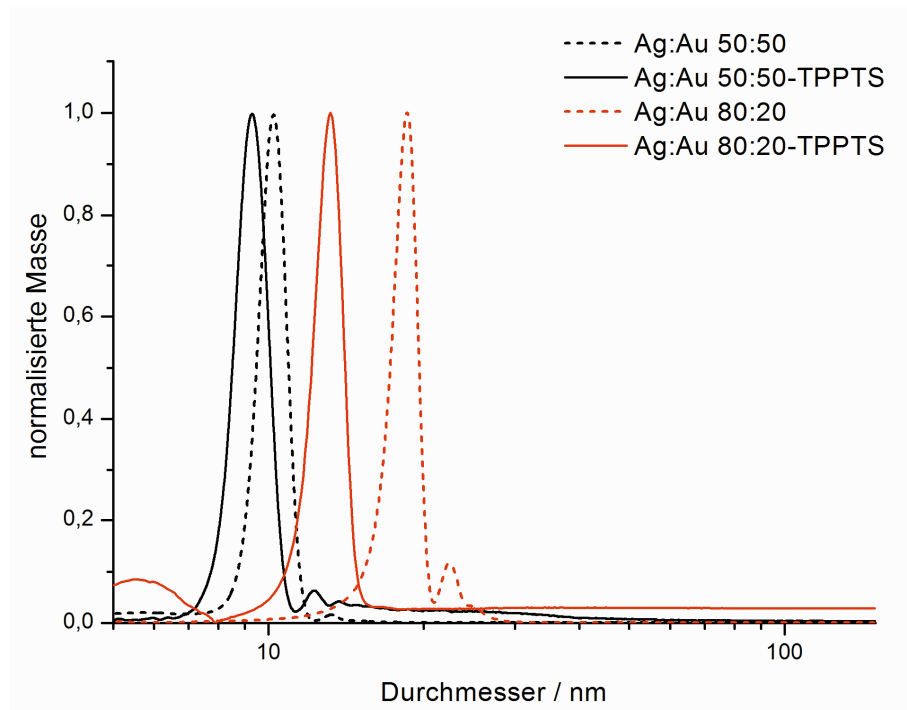
**Tabelle 12:** Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche masse-gewichtete Partikeldurchmesser PVP-stabilisierter Ag-Au-Nanopartikel aus der Citrat/Tannin-Reduktion, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser und aus REM-Aufnahmen ermittelte Durchmesser.

Ag:Au / mol%:mol%	D nach Masse (DCS) / nm	$\Delta(D)^*$ / nm	D nach Anzahl (DCS) / nm	D nach Anzahl (REM) / nm
0:100	10	+0,5	9,8	10±1
10:90	8,7	-1,2	8,6	9±2
20:80	8,7	-0,5	8,6	10±2
30:70	8,9	-0,7	8,8	10±3
40:60	9,0	-0,1	8,9	12±2
50:50	9,0	-1,2	8,9	13±1
60:40	10	-2	10	14±1
70:30	13	-5	13	14±2
80:20	16	-3	16	19±2
90:10	21	-2	20	25±4
100:0	29	-1	25	35±4

\* $\Delta(D)$  gibt den Unterschied der Durchmesser der Partikel vor und nach der PVP-Umfunktionalisierung an.

Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung TPPTS-funktionalisierter Ag-Au-Nanopartikel mittels DCS zeigten monomodale oder bimodale Verteilungen, die in einigen Fällen eine kleine Schulter im Bereich unterhalb der doppelten durchschnittlichen Partikelgröße aufwiesen. Es ist wahrscheinlich, dass diese kleinen Signale, analog zu den PVP-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln, von wenigen etwas größeren Partikeln herrühren und nicht Anzeichen für Agglomeration sind. Ein Vergleich zwischen TPPTS- und Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikeln ergab sowohl verringerte als auch vergrößerte durchschnittliche Partikeldurchmesser für Phosphan-funktionalisierte Nanopartikel. Im Falle von TPPTS-stabilisierte Ag:Au-50:50-Nanopartikel wurde z.B. vor der Umfunktionalisierung ein durchschnittlicher Durchmesser von 10 nm aus der massengewichteten Partikelgrößenverteilung ermittelt, nach der Umfunktionalisierung betrug der Durchmesser 9,1 nm. Bei Ag:Au-80:20-Nanopartikeln verringerte sich der Durchmesser von 19 nm nach der TPPTS-Funktionalisierung auf 13 nm. Die scheinbar zufällige Vergrößerung oder Verkleinerung der Partikeldurchmesser nach einer

Adsorption von TPPTS kann nicht mit einer verringerten effektiven Dichte der Nanopartikel erklärt werden. Es kann jedoch angenommen werden, dass die verringerte Stabilität der TPPTS-funktionalisierten Nanopartikel das Sedimentationsverhalten der Partikel im Dichtegradienten beeinflusst und es daher zu keiner konstanten Verringerung oder Vergrößerung des Partikeldurchmessers kommt. In Abbildung 43 sind zwei repräsentative massegewichtete Partikelgrößenverteilungen von bimetallic Nanopartikeln mit unterschiedlichen Zusammensetzungen vor und nach der Umfunktionalisierung gezeigt, die die scheinbare Verkleinerung bzw. Vergrößerung der TPPTS-stabilisierten Nanopartikel verdeutlichen.



**Abbildung 43: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an Citrat-stabilisierten Ag:Au-50:50- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln vor (gestrichelte Linie) und nach (durchgezogene Linie) der Umfunktionalisierung mit TPPTS.**

Aus den massegewichteten Größenverteilungen wurden trotz der unterschiedlich nach oben und unten abweichenden Größendifferenzen der Übersicht halber anzahlgewichtete Größenverteilungen errechnet, die ebenfalls in Tabelle 13 aufgeführt sind. Durch die Umrechnung von Masse in Anzahl resultieren in vielen Fällen leicht verringerte durchschnittliche Durchmesser, die zwischen 0,3 nm und 1 nm unter den massegewichteten Partikeldurchmessern liegen. Bei Nanopartikelsystemen mit gleichbleibenden

Partikeldurchmessern wurde nur eine nicht signifikante Verringerung des Durchmessers beobachtet.

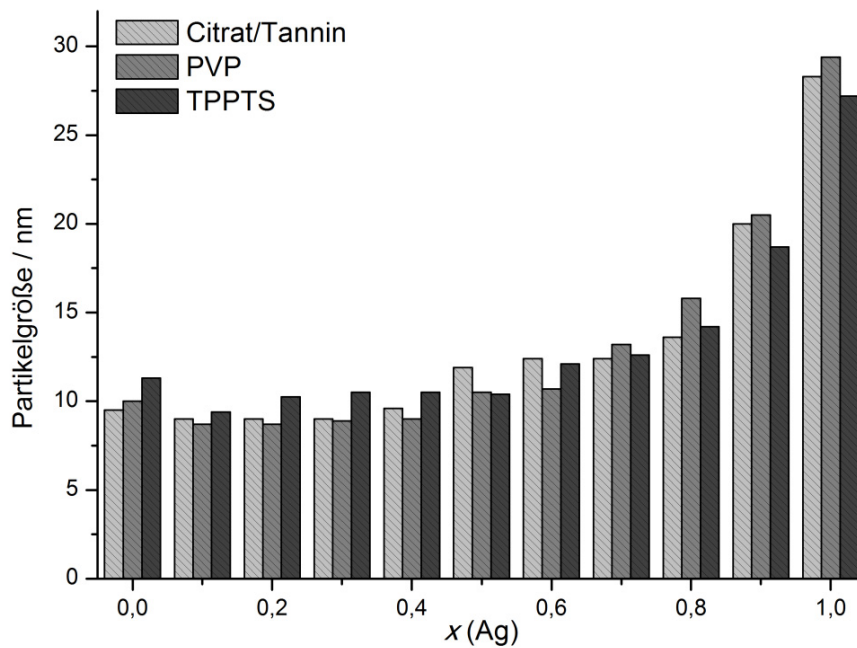
**Tabelle 13: Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche masse-gewichtete Partikeldurchmesser TPPTS-stabilsierter Ag-Au-Nanopartikel aus der Citrat/Tannin-Reduktion, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser.**

Ag:Au / mol%:mol%	D nach Masse (DCS) / nm	$\Delta(D)^*$ / nm	D nach Anzahl (DCS) / nm
0:100	11	+1,5	11
10:90	9,4	-0,1	9,1
20:80	10	-0,8	10
30:70	11	+1,4	10
40:60	11	+1,9	10
50:50	9,1	-1	9,0
60:40	12	n.s. <sup>#</sup>	12
70:30	13	-5	12
80:20	13	-6	13
90:10	23	n.s. <sup>#</sup>	22
100:0	28	n.s. <sup>#</sup>	27

\* $\Delta(D)$  gibt den Unterschied der Durchmesser der Partikel vor und nach der PVP-Umfunktionalisierung an.

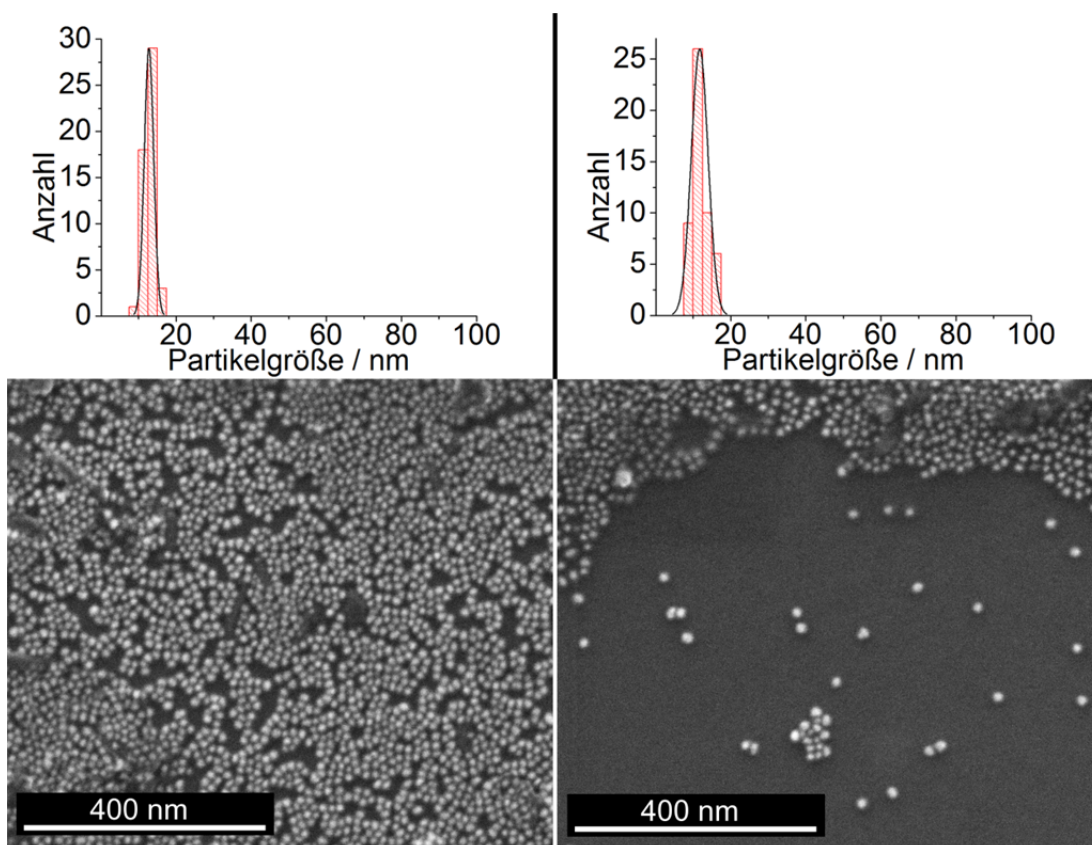
<sup>#</sup>n.s.: Nicht signifikanter Größenunterschied.

In Abbildung 44 ist eine Übersicht über die mittels DCS-Messungen ermittelten massengewichteten durchschnittlichen Partikeldurchmesser von Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikeln und umfunktionalisierten Ag:Au-PVP- und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln. Die Abbildung verdeutlicht die Verringerung der Partikeldurchmesser der Ag-Au-Nanopartikel nach PVP-Funktionalisierung und den Trend der zunehmenden Partikelgröße bei steigendem Silberanteil der bimetallischen Nanopartikel.



**Abbildung 44:** Übersicht über die mittels DCS ermittelten massegewichteten durchschnittlichen Partikeldurchmesser von Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikeln und umfunktionalisierten Ag:Au-PVP- und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln.

Um potentielle Morphologieänderungen zu charakterisieren und weitere Informationen über die Partikelgröße der umfunktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel zu erhalten, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Partikel angefertigt. Die Aufnahmen zeigen, dass die bimetalischen Nanopartikel nach Umfunktionalisierung unabhängig vom Liganden weiterhin sphärische Morphologie aufweisen. Die im Folgenden angegebene Partikelgröße, ermittelt durch manuelles Vermessen von mindestens 50 Nanopartikeln und Erstellen eines Histogramms, bezieht sich auf den modalen Durchmesser der erstellten Normalverteilung. In Abbildung 45 sind REM-Bilder von PVP-stabilisierten Ag:Au-50:50- und TPPTS-stabilisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln dargestellt. Die ermittelten durchschnittlichen Durchmesser von 13 nm (PVP) und 12 nm (TPPTS) liegen zwischen den aus anzahlgewichteten Größenverteilungen der DCS-Messungen ermittelten durchschnittlichen Durchmessern von 8,9 nm (PVP) und 11 nm (TPPTS) und den aus Anzahlverteilungen der DLS-Messungen ermittelten durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmessern von jeweils 14 nm.

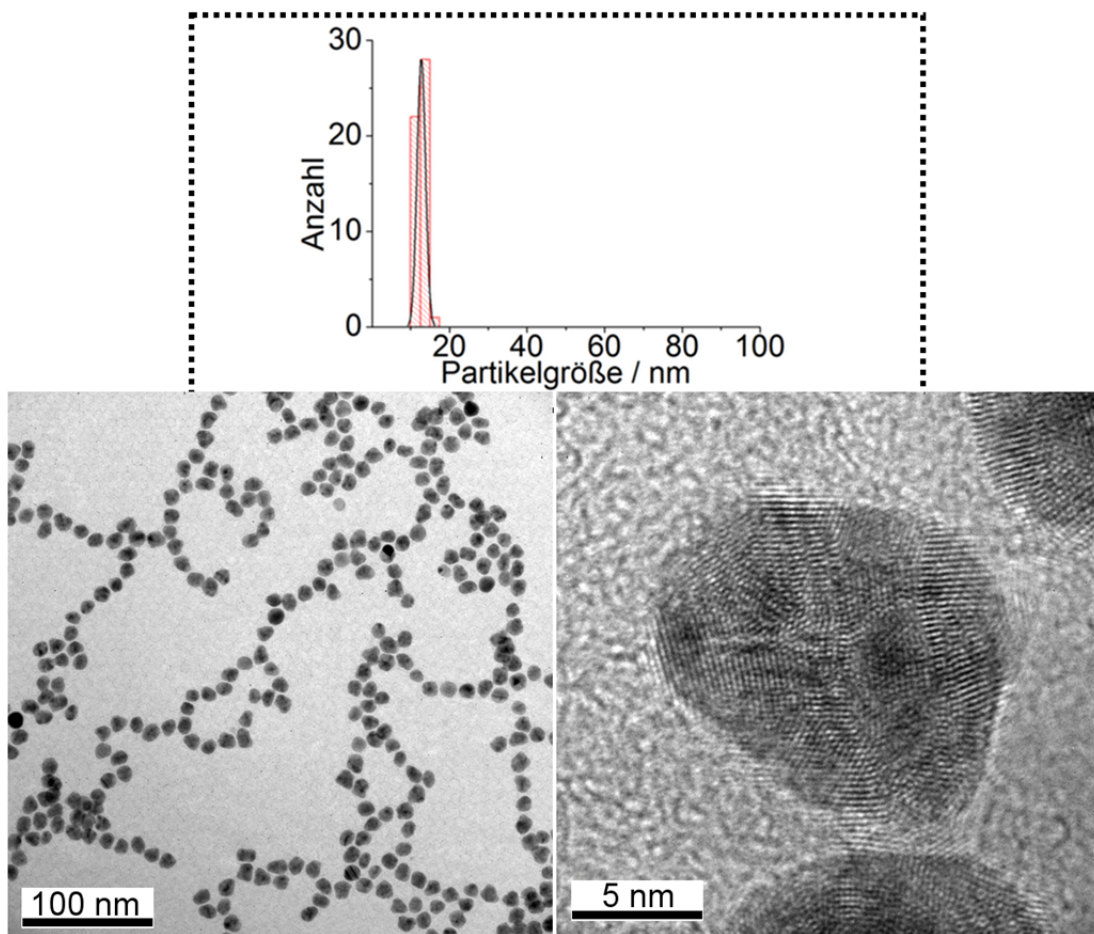


**Abbildung 45:** REM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-Au-50:50-Nanopartikeln,  $d = 13$  nm (links) und TPPTS-stabilisierten Ag:Ag-Au-50:50-Nanopartikeln,  $d = 12$  nm (rechts).

Die Unterschiede zwischen denen aus REM-Aufnahmen und Scheibenzentrifugmessungen können durch die Unterschätzung der Partikelgröße durch die DCS zu Stande kommen, die von einer verringerten effektiven Dichte der Nanopartikel durch die an der Oberfläche adsorbierten (Makro-) Moleküle herrührt. Dafür würde die Tatsache sprechen, dass durch das makromolekulare PVP stabilisierte Nanopartikel in der DCS einen kleineren durchschnittlichen Durchmesser aufwiesen als TPPTS-stabilisierte Nanopartikel, wohingegen die REM-Aufnahmen vergleichbare Partikelgrößen ergaben. Die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Durchmesser von 14 nm stimmen gut mit den REM-Aufnahmen überein, da die Lichtstreuung den typischerweise leicht vergrößerten hydrodynamischen Durchmesser der Nanopartikel angibt.

Um weitere Informationen über Partikelgröße und Morphologie zu erhalten und Aussagen über die Ultrastruktur und Kristallinität der Nanopartikel treffen zu können, wurden HR-TEM-Aufnahmen von Ag:Ag-Au-50:50-Nanopartikeln

nach Umfunktionalisierung mit PVP und TPPTS angefertigt. Abbildung 46 zeigt eine Übersichtsaufnahme und einen einzelnen stark vergrößerten Ag:Ag-50:50-PVP-Nanopartikel. Auf den HR-TEM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Nanopartikel polykristallin sind und die Morphologie leicht von einer idealen Sphäre abweicht, jedoch alle Partikel eine nur gering anisotrope quasisphärische Form haben. Die aus der Übersichtsaufnahme ermittelte durchschnittliche Partikelgröße von 12 nm entspricht nahezu der aus REM-Aufnahmen ermittelten Partikelgröße.

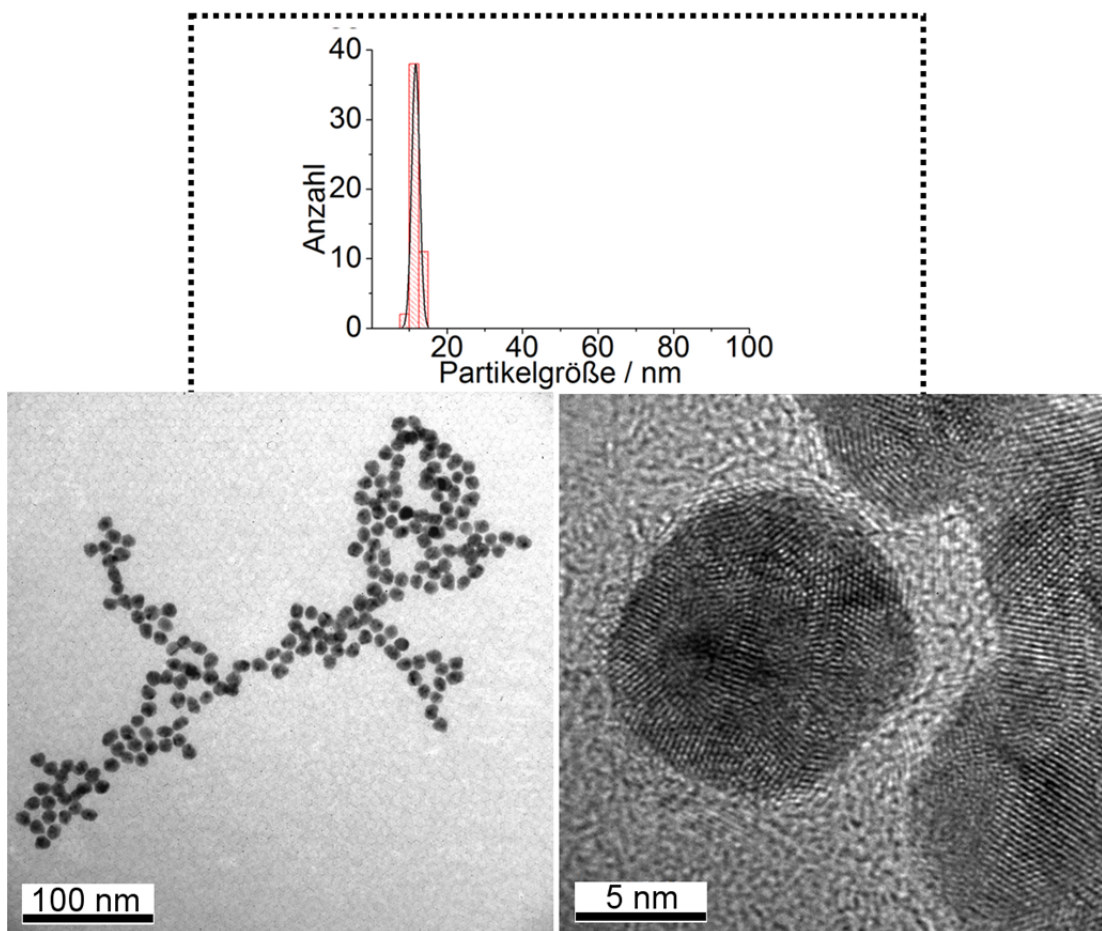


**Abbildung 46:** HR-TEM-Aufnahmen von Ag:Ag-50:50-PVP-Nanopartikeln,  $d = 12$  nm.

Aufnahmen der TPPTS-funktionalisierten Ag:Ag-50:50-Nanopartikel (Abbildung 47) zeigen ebenfalls polykristalline quasisphärische Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 13 nm. Die aus den TEM-Bildern ermittelte nahezu gleiche Partikelgröße stützt die Annahme, dass die Nanopartikel nach Reduktion durch das Gemisch aus Citrat und Tannin erst durch die Reduktionsmittelmoleküle bzw. deren Fragmente stabilisiert

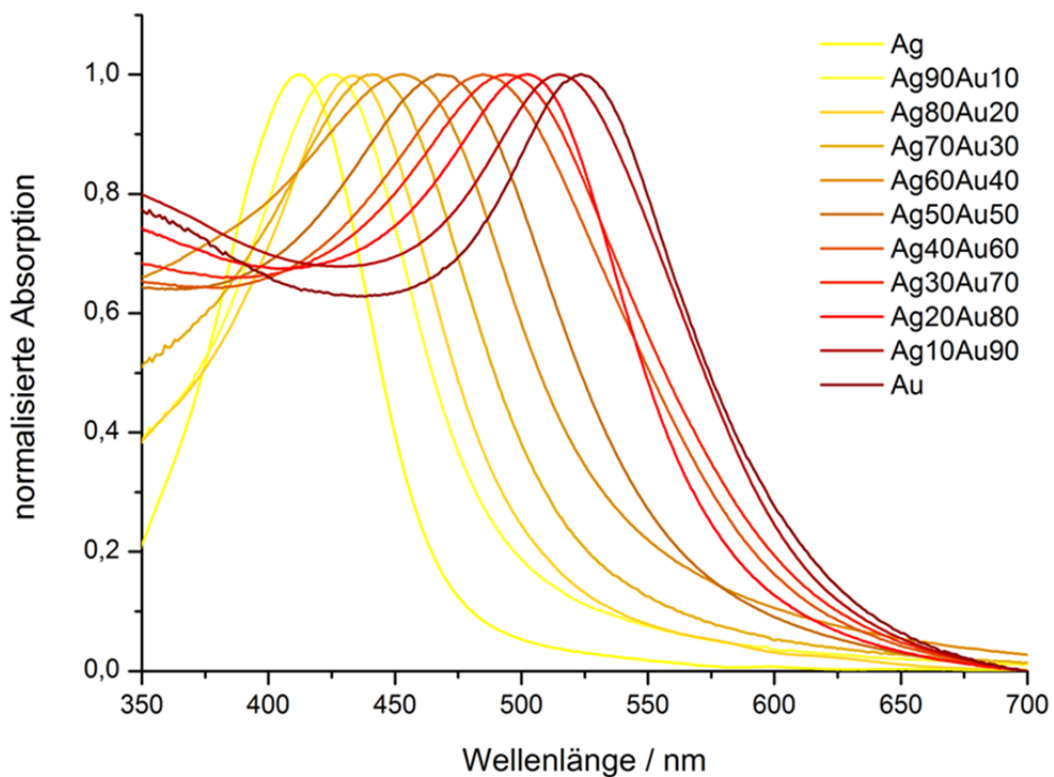


werden, die anschließend während der Umfunktionalisierung durch PVP oder TPPTS verdrängt werden. Analoge Beobachtungen wurden für Citrat-stabilisierte Au-Nanopartikel gemacht.<sup>[155]</sup> Auf Grund des identischen Kristallgitters (fcc) und nahezu identischen Gitterparameter von Silber und Gold sind keine Unterschiede zwischen Silber und Gold in der Elektronenbeugung zu erkennen. So lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob potentiell segregierte Kristallite aus isolierten Metallen oder eine homogene Durchmischung der Metalle innerhalb der unterschiedlichen Kristallite vorliegen.



**Abbildung 47:** HR-TEM-Aufnahmen von Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln,  $d = 13$  nm.

Analysen der PVP- und TPPTS-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel mittels UV-Vis-Spektroskopie wurden durchgeführt, um den Erhalt der inneren Legierungsstruktur nach Umfunktionalisierung der Partikel zu untersuchen. Die gemessenen Absorptionsspektren nach Ligandenaustausch wiesen analog zu den Ag:Au-Citrat/Tannin-Nanopartikeln nur ein schmales Maximum auf, was darauf schließen lässt, dass die innere Struktur der Partikel ihren hohen Legierungscharakter beibehalten hat. In Abbildung 48 sind die Plasmonenabsorptionsspektren der bimetallicen PVP-stabilisierten Nanopartikel und der reinen Ag- und Au-Nanopartikel dargestellt.

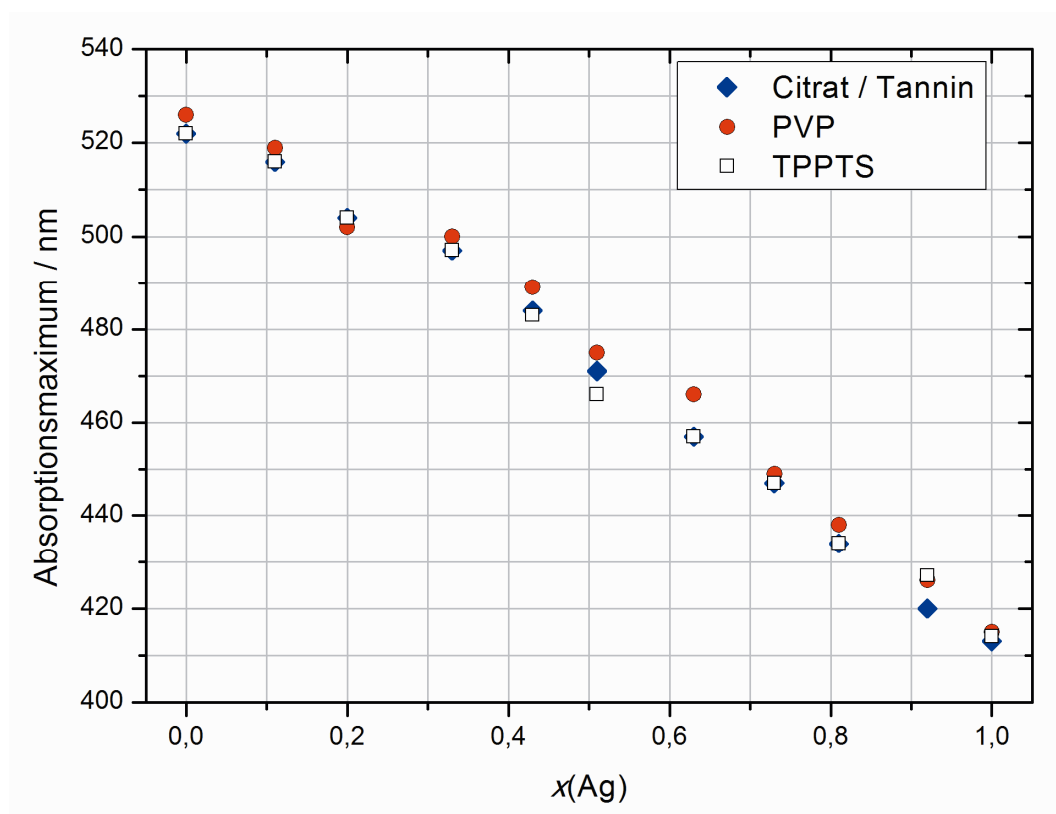


**Abbildung 48: Normalisierte Absorptionsspektren von PVP-stabilisierten bimetallicen Ag-Au-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Reduktion in neun unterschiedlichen Zusammensetzungen sowie von reinen Ag- und Au-Nanopartikeln.**

Die Auftragung der Maxima der mittels UV-Vis-Spektroskopie aufgezeichneten Plasmonenabsorptionsbanden von Ag:Au-Citrat/Tannin-, Ag:Au-PVP- und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  ist in Abbildung 49 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die nur geringe Abweichung von einem linearen Zusammenhang zwischen den beiden aufgetragenen Größen nach Umfunktionalisierung erhalten bleibt. Da ein



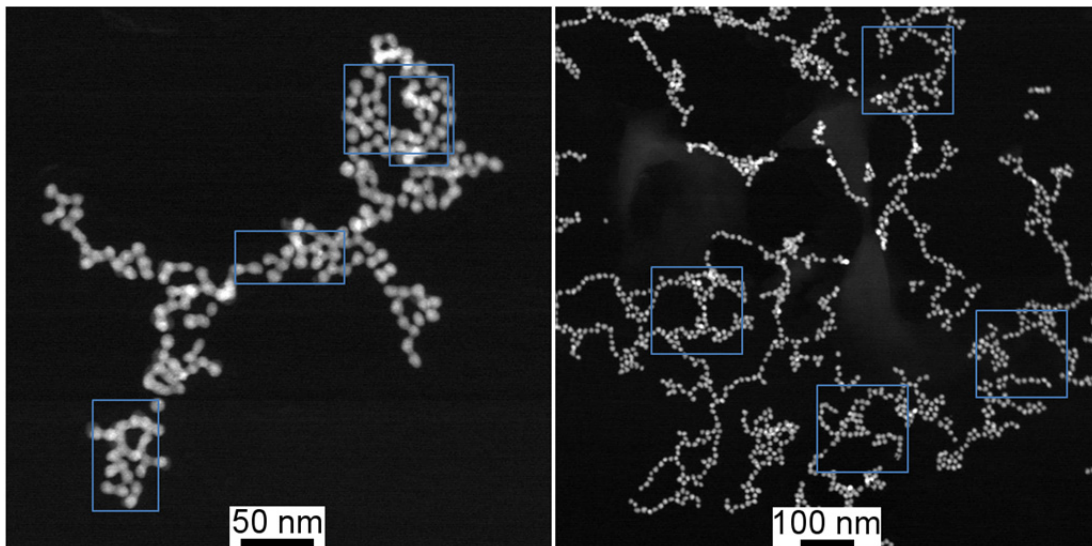
Ligandenaustausch an der Partikeloberfläche zu einer Veränderung des lokalen Brechungsindex oder der lokalen Dielektrizitätsumgebung führen kann, was eine Veränderung des elektrischen Feldes um die Partikel zur Folge hat, kann eine leichte Blauverschiebung der Maxima von Ag:Au-PVP-NPs um etwa 2-4 nm als Hinweis auf eine erfolgte Adsorption des Liganden PVP gewertet werden.<sup>[160]</sup> Die Funktionalisierung der Ag-Au-Nanopartikel mit TPPTS hat ein um wenige Nanometer blau- oder rotverschobenes Maximum der Plasmonenabsorption ohne Verlust der guten Übereinstimmung der Datenpunkte mit dem linearen Fit zur Folge. Da durch die im Vergleich zu den Ag:Au-PVP-Nanopartikeln etwas geringere Stabilität leichte Agglomerationserscheinungen nicht auszuschließen sind, ist eine eindeutige Ursache für die Verschiebung des Maximums nicht anzugeben.



**Abbildung 49:** Auftragung der Maxima der Plasmonenabsorptionsbanden Citrat/Tannin-stabilisierter Ag:Au-, Ag- und Au-Nanopartikel vor und nach PVP und TPPTS-Funktionalisierung gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  mit berechnetem linearen Fit.

Um weitere Aussagen über die innere Struktur und die Zusammensetzung der Ag:Au-50:50-PVP- und Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikel treffen zu können, wurden HAADF-EDX-Aufnahmen von beiden Partikelsystemen,

sowie eine STEM-EDX-Aufnahme eines einzelnen Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikels angefertigt. Die in Abbildung 50 dargestellten Dunkelfeldaufnahmen zeigen die durch blaue Rechtecke gekennzeichneten Bereiche, die für EDX-Messungen verwendet wurden. Es wurden unterschiedliche flächengemittelte Zusammensetzungen für die beiden Ag:Au-Partikelsysteme ermittelt. Während für PVP-stabilisierte Nanopartikel mit einer theoretischen molaren Zusammensetzung von 50:50 aus den gezeigten Messfeldern eine durchschnittliche molare Zusammensetzung von etwa 40:60 bestimmt wurde, ergaben die EDX-Messungen für TPPTS-funktionalisierte Nanopartikel eine Zusammensetzung von etwa 30:70 bei einem Messfehler von 2%.



**Abbildung 50: HAADF-Aufnahmen von Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikeln (links) und Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln (rechts). Die blauen Rechtecke kennzeichnen die für EDX-Messungen verwendeten Bereiche.**

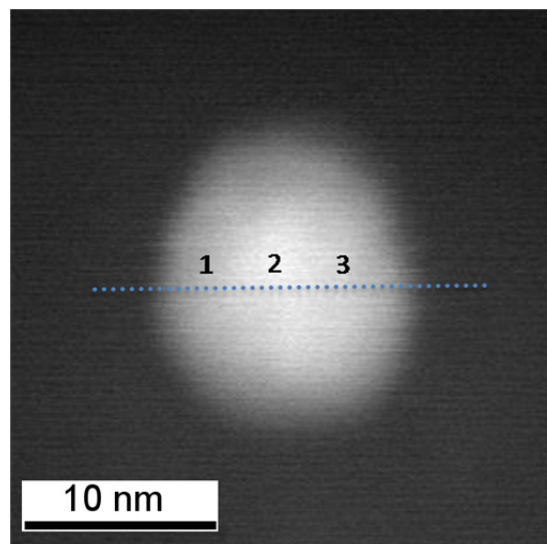
Zu beachten ist, dass die Umfunktionalisierung durch PVP und TPPTS an Ag:Au-50:50-Citrat/Tannin-Nanopartikeln aus der gleichen Partikelcharge durchgeführt wurde. In Tabelle 14 sind die mit HAADF-EDX-Aufnahmen gemessenen Element-Zusammensetzungen aufgeführt.

**Tabelle 14: Elementzusammensetzung von Ag:Au-50:50-PVP und Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln aus EDX-Messungen in den in Abbildung 50 gezeigten blauen Rechtecken der HAADF-Aufnahmen.**

Ligand	Element	Atom%
PVP	Ag	40 ± 2
	Au	60 ± 2
TPPTS	Ag	30 ± 2
	Au	70 ± 2

Die detaillierte Elementanalyse eines einzelnen Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikels wurde mittels EDX-Line-Scan im STEM-Modus mit einer räumlichen Auflösung von 1 nm gemessen. Die in Abbildung 51 gezeigte Aufnahme stellt die drei für die EDX-Analyse gewählten Messpositionen dar. Die EDX-Analyse ergab eine inhomogene Zusammensetzung des Nanopartikels mit variierenden Silber:Gold-Verhältnissen an allen drei Messpositionen. Insgesamt wurde ein erhöhter Anteil an Gold im Kern festgestellt, was darauf hindeutet, dass während der Darstellung der Nanopartikel das Gold schneller reduziert wird und daher während der schnellen Keimbildungsphase einen überproportionalen Anteil an der Nanopartikelbildung hat. Das darauffolgende langsame Partikelwachstum wird von Gold und Silber gleichermaßen bestimmt, so dass die Zusammensetzung außerhalb des Kerns eher den durch die HAADF-EDX-Aufnahmen ermittelten Zusammensetzungen entspricht.

Die genauen Elementzusammensetzungen des Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikels, bestimmt durch den EDX-Line-Scan, sind in Tabelle 15 aufgeführt. Ein Vergleich der mittels EDX bestimmten Elementzusammensetzung und den durch AAS-Analysen erhaltenen Messwerte zeigt, dass die EDX-Werte deutlich abweichen und einen höheren Goldanteil in den Partikeln ergeben.



**Abbildung 51:** STEM-Aufnahme eines einzelnen Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikels. Die angedeutete Linie zeigt den EDX-Line-Scan durch das Partikel mit drei gewählten Messpositionen.

Da die EDX-Messungen nur einen Bruchteil des Partikelsystems erfassen und innerhalb einer Ag:Au-50:50-Partikelcharge zwischen PVP- und TPPTS-Funktionalisierung bereits deutliche Unterschiede auftreten, ist zu vermuten, dass die gesamte Zusammensetzung der Probe, repräsentiert durch die AAS-Messungen, relativ gut mit den theoretischen Werten übereinstimmt, während es innerhalb eines Partikelensembles und auch innerhalb eines einzelnen Partikels zu einer inhomogenen Verteilung der Metalle kommt.

**Tabelle 15:** Elementzusammensetzungen des im STEM mittels EDX-Line-Scan untersuchten Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikels an drei unterschiedlichen Positionen.

Position	Element	Atom%	Ungenauigkeit aus Signal/Rausch-Verhältnis / %
1	Ag	45	4
	Au	55	9
2	Ag	26	3
	Au	74	9
3	Ag	33	4
	Au	67	10

### **4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von Ag-Au-Nanopartikeln mit Citrat und Tannin sowie deren Umfunktionalisierung mit PVP und TPPTS**

Mit der weiterentwickelten *Turkevich*-Methode unter Verwendung eines Gemisches aus Citrat und Tannin war es möglich, Citrat/Tannin-stabilisierte bimetallische Ag-Au-Nanopartikel mit verschiedenen Zusammensetzungen zu synthetisieren. Die Methode ist geeignet, um sphärische Ag-Au-Nanopartikel in mindestens neun verschiedenen Zusammensetzungen darzustellen. Im Vergleich zu den mittels Citrat-Reduktion dargestellten Nanopartikeln wurden eine deutlich erhöhte Stabilität und eine geringere Partikelgröße bei verbesserter Monodispersität beobachtet. Die aufgereinigten Ag-Au-Nanopartikel wiesen hydrodynamische Durchmesser zwischen 15 nm und 37 nm auf, der Durchmesser der metallischen Kerne lag zwischen 9,2 nm und 23 nm. Damit lagen die Partikelgrößen der bimetallischen Nanopartikel zwischen den mit gleichen Reaktionsparametern dargestellten reinen Silber- und Gold-Partikeln. Auffällig war ein zusammensetzungsabhängiger Größentrend. Während die Ag:Au-Citrat/Tannin-Partikel mit molaren Verhältnissen von Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-50:50 nahezu die gleiche Partikelgröße aufwiesen, nahm der Durchmesser für Partikel mit höherem Silberanteil stetig zu. Dieser zusammensetzungsabhängige Größentrend könnte von der unterschiedlich schnellen Reduktion von Gold und Silber herrühren. Da Silber langsamer reduziert wird, würden in Partikeln mit hohem Silberanteil weniger Nukleationskeime gebildet, was zu einem stärker ausgeprägten Wachstum und damit zu größeren Nanopartikeln führt. Es konnte mittels UV-Vis-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Nanopartikel einen hohen Legierungscharakter aufwiesen. AAS-Analysen bestätigten eine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen theoretischen und tatsächlichen Ag:Au-Zusammensetzungen der Partikel. Mit Hilfe von DLS-, DCS- und Zetapotentialmessungen wurde ein Ligandenaustausch durch PVP und TPPTS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Umladung der Partikel erfolgreich durchgeführt wurde. Die Beobachtungen ähneln den in der Literatur beschriebenen Versuchen zur Funktionalisierung von Au-Citrat-

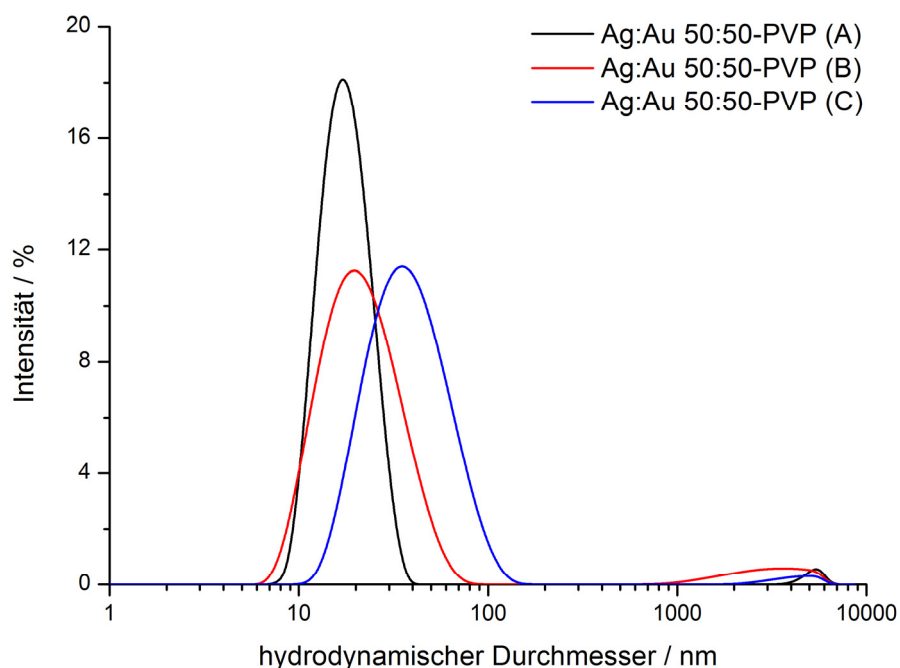
Nanopartikeln mit identischen Liganden. Durch die Funktionalisierung mit TPPTS wurde die Stabilität der Partikel allerdings nicht erhöht, und es kam teilweise zu Agglomerationserscheinungen. HR-TEM-Untersuchungen der Zusammensetzung und Ultrastruktur von umfunktionalisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln ergaben, dass die polykristallinen Nanopartikel eine inhomogene Zusammensetzung aufwiesen, die sich im Falle eines untersuchten Partikels durch eine erhöhte Goldkonzentration im Kern äußerte. Wahrscheinlich ist dies mit einer unterschiedlich schnellen Reduktion von Silber und Gold während der initialen Keimbildungsphase zu erklären. Mit PVP und TPPTS umfunktionalisierte und aufgereinigte Ag:Au-50:50-Citrat/Tannin-Nanopartikel aus der hier beschriebenen Syntheseroute wurden für zellbiologische Untersuchungen verwendet.

### **4.3.1 Einfluss der Konzentration des Reduktionsmittelgemisches (Citrat/Tannin) auf die resultierende Partikelgröße**

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von Möglichkeiten zur Kontrolle der Partikelgröße der bimetallischen Ag-Au-Nanopartikel. Als Ansatz zur potentiellen Größenkontrolle wurde der Einfluss der Konzentration des Gemisches an Trinatriumcitrat und Tannin bei ansonsten gleichbleibenden Reaktionsparametern auf die resultierende Partikelgröße untersucht. Der Theorie nach sollte eine verminderte Reduktionsmittelkonzentration zu größeren Partikeln führen, da die Nukleation durch die kleinere Stoffmenge des Reduktionsmittels verlangsamt und daher die Anzahl der Nukleationskeime reduziert werden sollte. Durch die geringere Anzahl an Keimen würde mehr Metall im langsamen Wachstumsprozess zur Verfügung stehen und damit zu größeren Partikeldurchmessern führen.<sup>[51,162]</sup> Analog dazu war zu erwarten, dass eine erhöhte Konzentration an Reduktionsmittel zu kleineren Nanopartikeln führt.

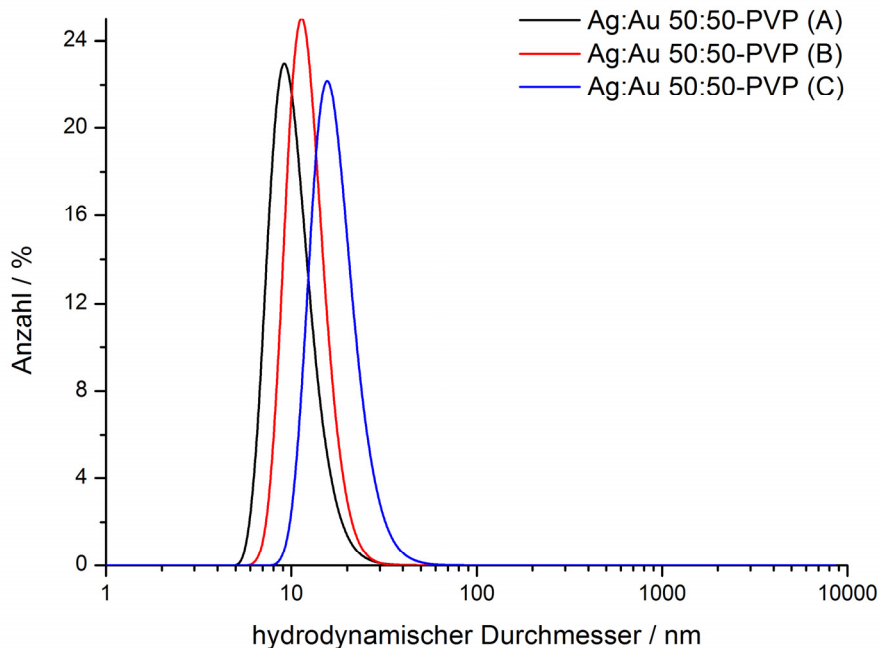
Die zur Untersuchung des Einflusses der Reduktionmittelkonzentration mit 0,75-facher und 1,5-facher Konzentration an Citrat und Tannin dargestellten Ag:Au-50:50-Nanopartikel wurden zur Erhöhung der Stabilität mit PVP umfunktionalisiert und mittels DLS und DCS hinsichtlich ihrer Partikelgröße untersucht. Die in Abbildung 52 gezeigten intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen der mit verringerter (A) und erhöhter

Reduktionsmittelkonzentration (C) dargestellten Partikel zeigen einen monomodalen Verlauf, es wurde jedoch im Bereich von  $> 1 \mu\text{m}$  geringe Intensität detektiert, die auf Messartefakte oder sehr wenige makroskopische Agglomerate zurückzuführen ist. Die PDIs von 0,187 (A) und 0,215 (C) sprechen für gute Monodispersität. Verteilungskurve (B) repräsentiert Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikel, die mit regulärer Reduktionsmittelkonzentration (siehe Abschnitt 4.2.1) dargestellt wurden. Die aus den Intensitätsverteilungen ermittelten hydrodynamischen Durchmesser von 17 nm (A) und 34 (C) liegen unterhalb und oberhalb des durchschnittlichen Durchmessers der mit regulärer Konzentration dargestellten Ag:Au-50:50-Nanopartikel ( $d = 20 \text{ nm}$ ).



**Abbildung 52: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln aus Synthesen mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen (Citrat/Tannin); A: 1,5-fache Konzentration, B: Standardsynthese, C: 0,75-fache Konzentration, gemessen mit DLS.**

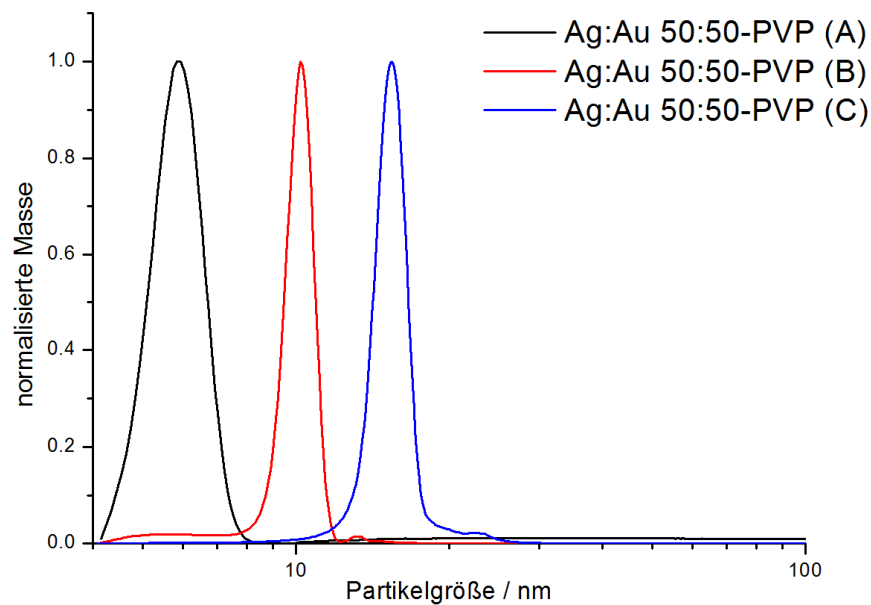
Die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikel sind in Abbildung 53 dargestellt. Die durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser sind entsprechend der Gewichtung mit 8 nm und 16 nm kleiner, liegen allerdings ebenfalls unterhalb bzw. oberhalb des Durchmessers der Partikel aus der Standard Citrat/Tannin-Synthese (11 nm).



**Abbildung 53: Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Synthese mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen (Citrat/Tannin) A: 1,5-fache Konzentration, B: Standardsynthese, C: 0,75-fache Konzentration, gemessen mit DLS.**

DCS-Analysen der mit erhöhter und verringerter Reduktionsmittelkonzentration dargestellten Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikel zeigten monomodale Partikelgrößenverteilungen. In Abbildung 54 sind repräsentative mittels DCS aufgezeichnete Partikelgrößenverteilungen abgebildet. Die mit 0,75-facher Reduktionsmittelmenge dargestellten Nanopartikel (A) wiesen einen massegewichteten durchschnittlichen Durchmesser von 16 nm auf, während der Durchmesser der mit 1,5-facher Reduktionsmittelmenge dargestellten Partikel (C) 5,9 nm betrug. Die zum Vergleich dargestellten Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikel aus der Standardsynthese lagen mit einem Durchmesser von 10 nm dazwischen. Die anzahlgewichteten durchschnittlichen Durchmesser der mit veränderter Reduktionsmittelkonzentration dargestellten Nanopartikel lagen der Gewichtung entsprechend mit 15 nm und 5,7 nm leicht unter den massegewichteten Durchmessern.





**Abbildung 54: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an PVP-stabilisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Synthese mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen.**

Ein Vergleich der anzahlgewichteten durchschnittlichen Durchmesser aus DLS und DCS zeigt eine relative gute Übereinstimmung unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die DLS den hydrodynamischen Durchmesser wiedergibt und die DCS die Partikelgröße auf Grund der durch PVP-Adsorption verringerten effektiven Dichte leicht unterschätzt. In Tabelle 16 ist ein Vergleich der Partikelgrößen der mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen dargestellten Ag:Au-50:50-Nanopartikel dargestellt.

**Tabelle 16: Übersicht über die aus DLS und DCS erhaltenen durchschnittlichen Partikelgrößen von Ag:Au-50:50-PVP-Nanopartikeln, synthetisiert mit unterschiedlichen Reduktionsmittelkonzentrationen**

Reduktionsmittel- konzentration	DLS (Int.) / nm	DLS (Anz.) / nm	DCS (Masse) / nm	DCS (Anzahl) / nm
0,75-fach	35	16	16	15
Standard	20	11	10	9,9
1,5-fach	17	8	5,9	5,7

Der durch die Variation der Reduktionsmittelkonzentration realisierte Größenunterschied der resultierenden Nanopartikel entsprach den Erwartungen. So konnten durch eine Verringerung der Reduktionsmittelkonzentration im Vergleich zur Standardkonzentration größere Nanopartikel dargestellt werden, eine Erhöhung der Reduktionsmittelkonzentration führte bei ansonsten unveränderten Reaktionsparametern zu deutlich kleineren Nanopartikeln.

### **4.3.2 Reduktion von $\text{Au}^{3+}$ und $\text{Ag}^+$ mit 1,5-facher Konzentration an Trinatriumcitrat und Tannin**

Der im Standard-Syntheseprotokoll der Co-Reduktion von  $\text{Au}^{3+}$  und  $\text{Ag}^+$  mit einem Gemisch aus Citrat und Tannin zu beobachtende Trend der Partikelgrößenzunahme bei steigendem Silberanteil wurde im Hinblick auf zellbiologische Untersuchungen als ungünstig erachtet, da eine Trennung von silberanteilabhängiger Toxizität nicht vom potentiellen Größeneffekt trennbar gewesen wäre. Daher wurde eine Synthese von Ag-Au-Nanopartikeln in unterschiedlichen Zusammensetzungen mit erhöhter Reduktionsmittelkonzentration untersucht. Durch die erhöhte Reduktionsmittelmenge sollte die Reduktion des Silbers in Synthesen mit erhöhtem Silberanteil beschleunigt werden, um einen zusammensetzungsabhängigen Größenunterschied der Nanopartikel zu unterdrücken.

Die durch Co-Reduktion von  $\text{Au}^{3+}$  und  $\text{Ag}^+$  in wässrigem Medium mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration und anschließender PVP-Stabilisierung dargestellten Ag-Au-Nanopartikel konnten mittels Ultrazentrifugation von überschüssigen Reaktanden abgetrennt werden. Die aufgereinigten Ag:Au-PVP-Nanopartikel wurden mit DLS und DCS untersucht und mit den nach identischem Syntheseprotokoll dargestellten reinen Ag- und Au-Nanopartikeln verglichen. Des Weiteren wurden Plasmonenabsorptionsspektren aufgezeichnet um Aussagen über den Legierungscharakter der Partikel treffen zu können. Zur weiteren Charakterisierung wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mit REM und TEM angefertigt. Zur Untersuchung der Ultrastruktur der Nanopartikel wurden Röntgenpulverdiffraktogramme aufgenommen.

Die elementare Zusammensetzung der aufgereinigten Nanopartikel wurde mittels AAS bestimmt. Wie in Tabelle 17 dargestellt, wichen die experimentell ermittelten Werte geringfügig von den theoretischen molaren Zusammensetzungen ab. Es ist jedoch eine klare Unterscheidung der neun unterschiedlichen Zusammensetzungen möglich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Nanopartikel im Folgenden ausschließlich mit ihrer theoretischen Zusammensetzung bezeichnet.

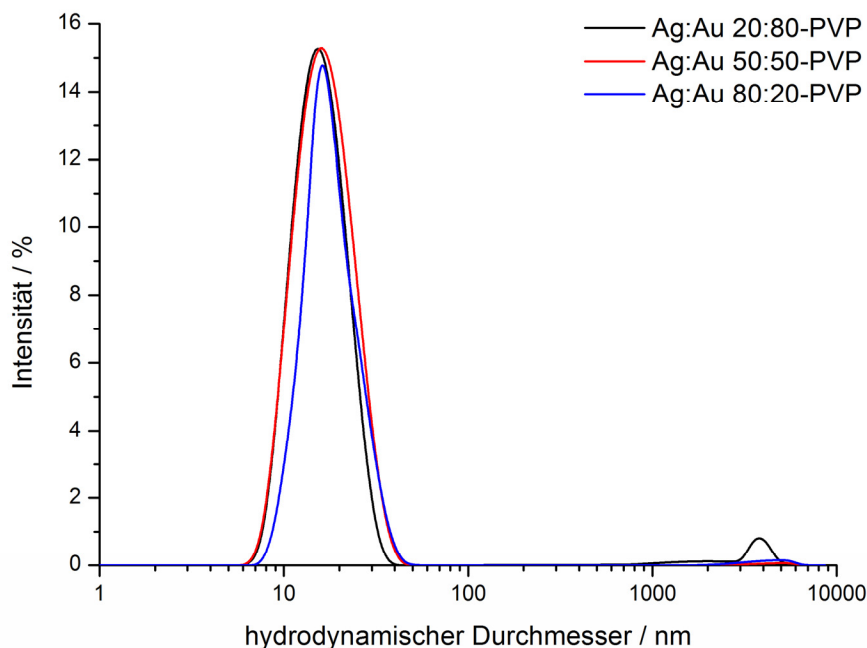
**Tabelle 17: Bestimmung der molaren Zusammensetzung der mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration dargestellten PVP-stabilisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikel mittels AAS**

Theoretische molare Ag:Au-Zusammensetzung	Molare Ag:Au-Zusammensetzung laut AAS
10:90	8 : 92
20:80	17 : 83
30:70	29 : 71
40:60	37 : 63
50:50	49 : 51
60:40	58 : 42
70:30	68 : 32
80:20	78 : 22
90:10	87 : 13

Analysen mittels dynamischer Lichtstreuung ergaben unabhängig von der Zusammensetzung der Partikel monomodale Partikelgrößenverteilungen und PDIs zwischen 0,1 und 0,3. Auf Grund der Monodispersität und der Monomodalität der Größenverteilungen entsprechen die im Folgenden angegebenen durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser sowohl modalem Durchmesser, als auch *z-Average*. Die gemessenen Intensitätsverteilungen der Ag:Au-PVP-Nanopartikel ergaben hydrodynamische Durchmesser zwischen 15 nm und 20 nm. Die reinen Silber- und Gold-Partikel wiesen durchschnittliche hydrodynamische Partikeldurchmesser auf, die mit 14 nm (Au) und 37 nm (Ag) leicht unterhalb bzw. deutlich oberhalb der Legierungen mit höchstem Goldanteil bzw.

Silberanteil lagen. Verglichen mit den durch die Standardsynthese dargestellten Nanopartikeln wurden in allen Fällen kleinere Partikeldurchmesser ermittelt. Entscheidend war, dass eine nahezu einheitliche Partikelgröße der bimetallic Ag:Ag-Au-Partikel unabhängig von der Zusammensetzung der Eduktlösung gemessen wurde.

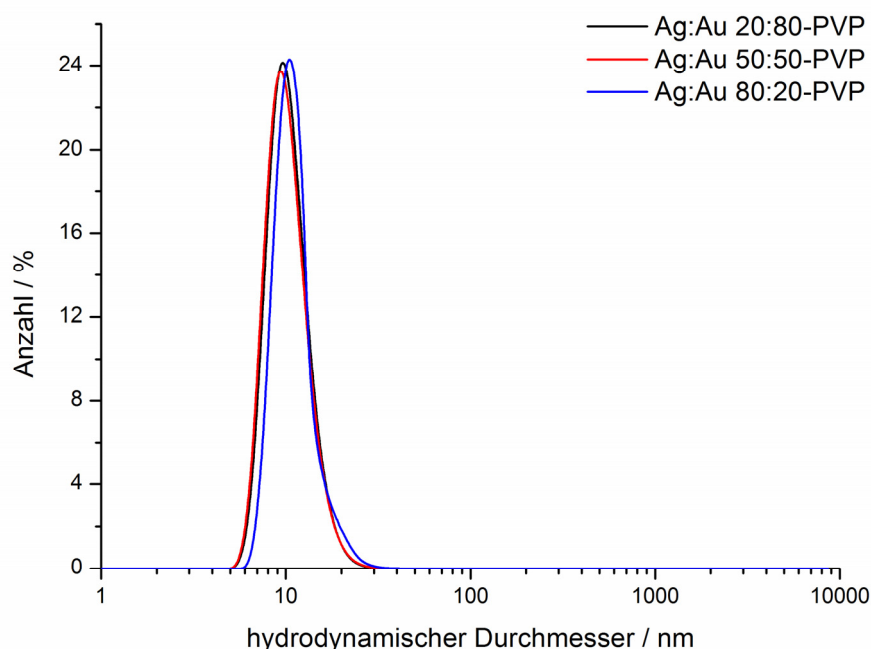
In Abbildung 55 sind repräsentative intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-Au-20:80-, Ag:Ag-Au-50:50- und Ag:Ag-Au-80:20-Nanopartikeln dargestellt.



**Abbildung 55: Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Ag-Au-20:80-, Ag:Ag-Au-50:50- und Ag:Ag-Au-80:20-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Reduktion mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration, gemessen mit DLS.**

Die im Vergleich zur regulären Citrat/Tannin-Reduktion zusammensetzungsunabhängige einheitliche hydrodynamische Partikelgröße von 15 - 16 nm wird deutlich. Dennoch sind im Bereich oberhalb von 1  $\mu\text{m}$  kleine Signale zu erkennen. Da die DLS-Messungen an aufgereinigten Proben durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei Intensitäten im Mikrometerbereich um vereinzelte sehr große Agglomerate handelt.

Analog zu vorherigen Messungen wurden die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelt. In Abbildung 56 sind drei repräsentative Anzahlverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Au-20:80-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln gezeigt, die der Gewichtung entsprechend leicht verringerte durchschnittliche hydrodynamische Durchmesser von 10 nm (Ag:Au-20:80 und Ag:Au-50:50) und 12 nm (Ag:Au-80:20) ergaben. Die intensitätsgewichteten und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration dargestellten PVP-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikel sind in Tabelle 18 aufgeführt.



**Abbildung 56: Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten Ag:Au-20:80-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Reduktion mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration aus DLS-Messungen.**

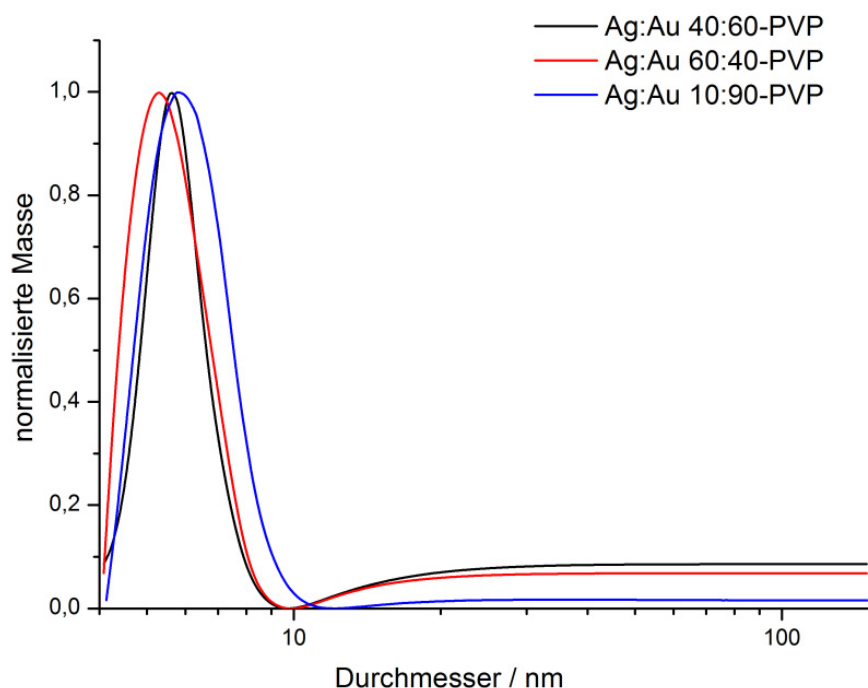
Messungen der elektrophoretischen Mobilität ergaben negative Zetapotentiale zwischen -23 mV und -42 mV. Damit ähneln sie den Zetapotentialen der mit der regulären Reduktionsmittelkonzentration dargestellten Ag:Au-PVP-Nanopartikeln, was darauf hindeutet, dass auch in diesem Fall nach der Umfunktionalisierung mit PVP noch Citrat oder Tannin bzw. Fragmente auf der Oberfläche der Partikel adsorbiert bleiben. Die Zetapotentiale der mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration dargestellten PVP-stabilisierten Nanopartikel sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18: Ergebnisse von DLS- und Zetapotentialmessungen an Ag:Au-PVP-Nanopartikeln aus Synthesen mit 1,5-facher Konzentration an Citrat/Tannin.**

Ag:Au / mol%:mol%	$D_h$ nach Intensität (DLS) / nm	$D_h$ nach Anzahl (DLS) / nm	PDI	Zetapotential / mV
0:100	14	9,1	0,122	-31
10:90	16	10	0,133	-33
20:80	15	10	0,296	-47
30:70	20	12	0,257	-31
40:60	15	10	0,274	-23
50:50	15	10	0,214	-25
60:40	18	11	0,226	-39
70:30	19	11	0,180	-39
80:20	16	12	0,216	-42
90:10	18	12	0,196	-33
100:0	37	22	0,161	-22

Untersuchungen der Partikelgrößenverteilung PVP-funktionalisierter Ag-Au-Nanopartikel mit Hilfe der DCS zeigten monomodale Verteilungen mit geringer Breite, was auf hinreichende Monodispersität schließen lässt. Die aus den massegewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelten durchschnittlichen Partikeldurchmesser der Ag-Au-Nanopartikel lagen zwischen 5,5 nm und 6,4 nm und zeigten keinen zusammensetzungsabhängigen Größentrend. Die reinen Au-Nanopartikel wiesen einen minimal verringerten Partikeldurchmesser von 4,8 nm auf, während die reinen Ag-Nanopartikel mit 21 nm deutlich größer waren. In Abbildung 57 sind drei repräsentative massegewichtete Partikelgrößenverteilungen von PVP-stabilisierten bimetallischen Ag:Au-40:60-, Ag:Au-60:40- und Ag:Au-90:10-Nanopartikeln aus Synthesen mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration gezeigt, die die Monodispersität und die nahezu identische Partikelgröße der unterschiedlichen Partikelsysteme verdeutlichen. Zu beachten ist, dass die in den dargestellten Größenverteilungen erkennbaren Minima bei etwa 10 nm eine Folge der Datennormalisierung auf 1,0 sind. Da die Basislinie während der DCS-Messungen in einigen Fällen bei etwa 10 nm kurz in negative Bereiche abfiel,

wird die restliche Basislinie in den normalisierten Kurvenverläufen erhöht dargestellt und der negative Basislinienwert auf 0 gesetzt.



**Abbildung 57: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an PVP-stabilisierten Ag:Au-40:60-, Ag:Au-40:60- und Ag:Au-90:10-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin Synthese mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration.**

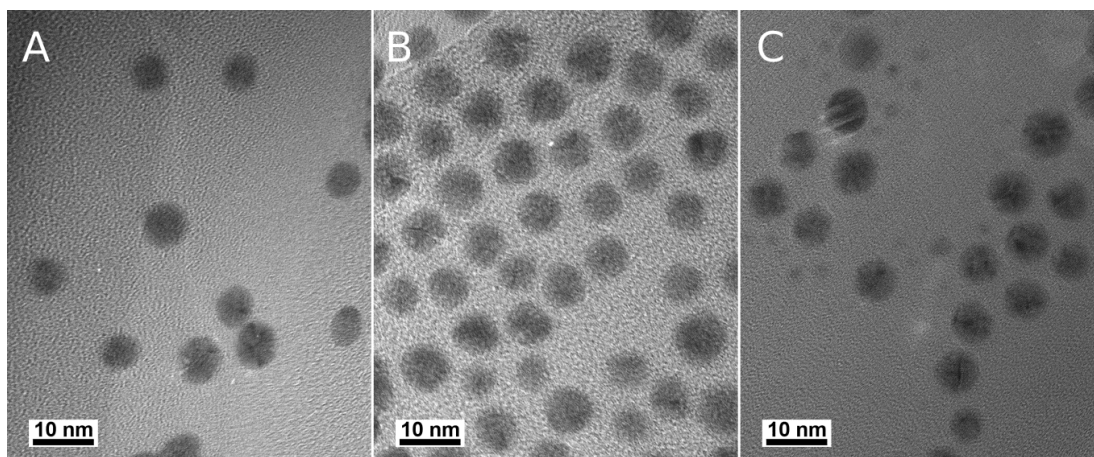
Die aus massegewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelten durchschnittlichen Durchmesser der PVP-funktionalisierten Ag:Au-Nanopartikel sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die Größendifferenz der Partikel zu den Citrat/Tannin-stabilisierten Nanopartikeln betrug zwischen 0,1 nm und 4,4 nm. Die Au-PVP-Nanopartikel hatten einen 0,5 nm größeren Durchmesser. Aus den massegewichteten Größenverteilungen wurden zwecks Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzahlgewichtete Verteilungen errechnet, die ebenfalls in Tabelle 19 aufgeführt sind.

**Tabelle 19:** Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche masse-gewichtete Partikeldurchmesser PVP-stabilsierter Ag-Au-Nanopartikel aus Citrat/Tannin-Reduktion mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser.

Ag:Au / mol%:mol%	<i>D</i> nach Masse (DCS) /	<i>D</i> nach Anzahl (DCS) /
	nm	nm
0:100	4,8	4,7
10:90	5,8	5,4
20:80	6,2	5,6
30:70	6,0	5,4
40:60	5,3	5,0
50:50	5,9	5,7
60:40	5,6	5,5
70:30	5,5	5,2
80:20	5,7	5,4
90:10	6,4	5,5
100:0	21	17

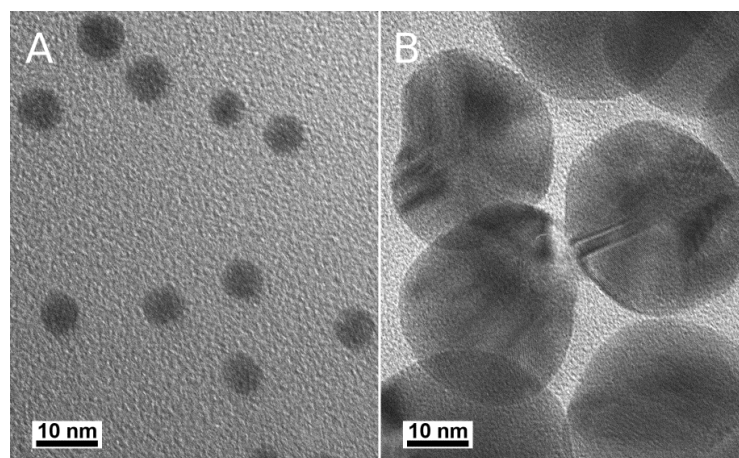
Um weitere Informationen über Partikelgröße und Morphologie zu erhalten und Aussagen über die Ultrastruktur und Kristallinität der Nanopartikel treffen zu können, wurden TEM-Aufnahmen der Nanopartikel angefertigt. Abbildung 58 zeigt repräsentative TEM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Ag:Au-10:90- (A), Ag:Au-30:70- (B), und Ag:Au-70:30-Nanopartikeln (C) aus Synthesen mit 1,5-facher Reduktionsmittelmenge. Die Aufnahmen zeigen, dass die Nanopartikel weitgehend monodispers sind und quasisphärische Morphologie aufweisen. Die Ag-Au-Nanopartikel waren kristallin und nicht verzwilligt. Die Partikelgröße wurde durch manuelles Auszählen und Vermessen von mindestens 50 Partikeln ermittelt. Unabhängig von der Zusammensetzung ergab sich für die bimetallischen Nanopartikel ein durchschnittlicher Durchmesser von etwa 7 nm.





**Abbildung 58:** TEM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Nanopartikeln aus Synthese mit 1,5-facher Reduktionsmittelmenge, A: Ag:Au-10:90,  $d = 6,5$  nm; B: Ag:Au-30:70,  $d = 7,1$  nm; C: Ag:Au-70:30,  $d = 7,1$  nm.

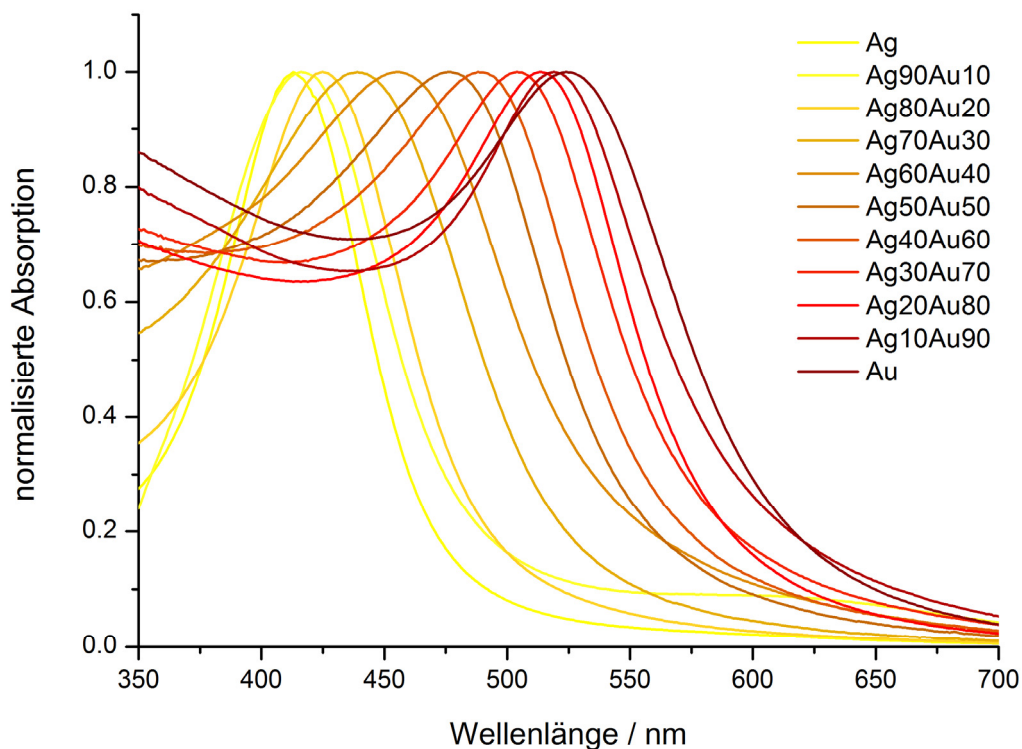
Lediglich für die zwei Nanopartikelsysteme mit höchstem Silberanteil ergaben sich mit Durchmessern von 8,5 nm (Ag:Au-80:20) und 12 nm (Ag:Au-90:10) Abweichungen von der einheitlichen Partikelgröße. Ein Vergleich mit den DCS- und DLS-Messungen zeigt, dass die Messwerte gut übereinstimmen. Eine Ausnahme stellen die Ag:Au-20:80- und Ag:Au-90:10-Systeme dar. Die Abweichungen zwischen den von TEM-Aufnahmen und den mittels DLS und DCS bestimmten Durchmessern könnte durch Alterung zu erklären sein, da die TEM-Aufnahmen mit zeitlicher Verzögerung zu den anderen Messmethoden angefertigt wurden.



**Abbildung 59:** TEM-Aufnahmen von PVP-stabilisierten Nanopartikeln aus Synthese mit 1,5-facher Reduktionsmittelmenge, A: Au,  $d = 4,8$  nm; B: Ag,  $d = 29$  nm.

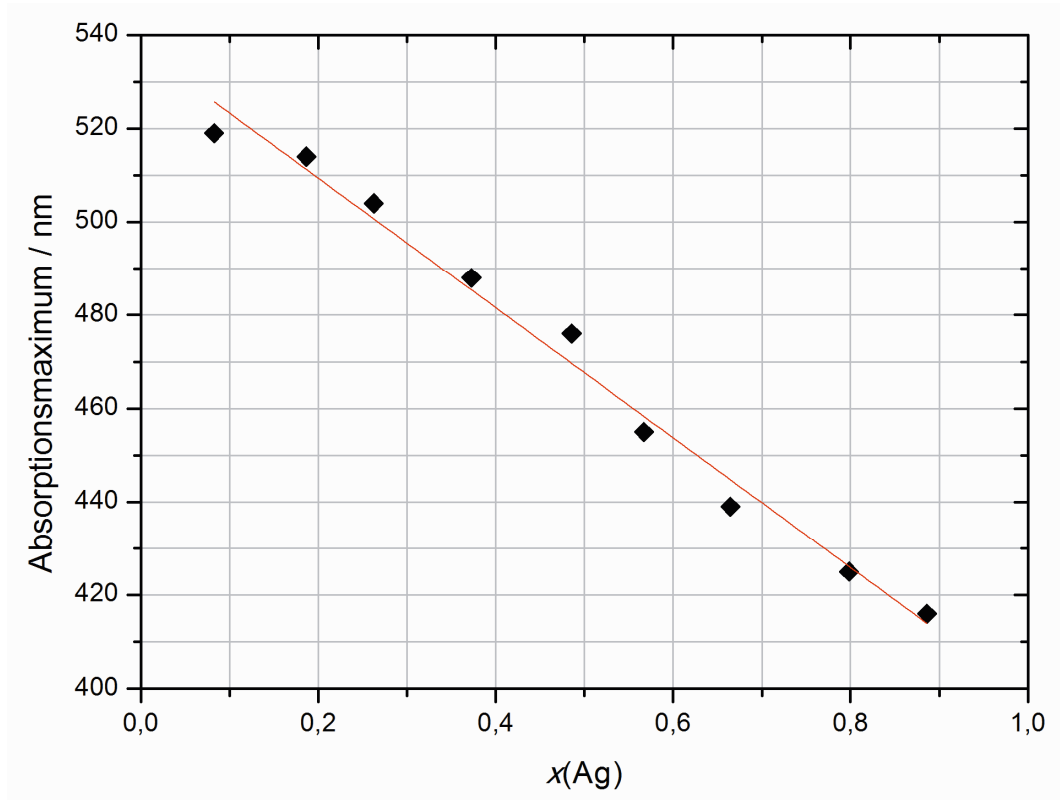
Für reine Ag- und Au-Nanopartikel wurden im TEM Durchmesser von 4,8 nm und 29 nm ermittelt, was mit den DCS- und DLS-Messwerten in etwa übereinstimmt. Im Gegensatz zu den bimetallicen Nanopartikeln ist auf der Aufnahme der reinen Silberpartikel deutlich eine mehrfach verzwilligte kugelförmige Morphologie zu erkennen.

Um Aussagen über die innere Struktur der PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel treffen zu können, wurden die Plasmonenabsorptionsspektren mittels UV-Vis-Spektroskopie aufgezeichnet. Die gemessenen Absorptionsspektren, dargestellt in Abbildung 60, wiesen nur ein schmales Maximum auf, was darauf schließen lässt, dass die innere Struktur der Partikel einen hohen Legierungscharakter hat.



**Abbildung 60: Normalisierte Absorptionsspektren von PVP-stabilisierten bimetallicen Ag-Au-Nanopartikeln aus Citrat/Tannin-Reduktion mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration.**

Eine Auftragung der Absorptionsmaxima der Plasmonenabsorptionsspektren gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  ist in Abbildung 61 dargestellt. Es sind nur leichte Abweichungen der Absorptionsmaxima vom idealen linearen Zusammenhang mit dem Molenbruch zu erkennen.



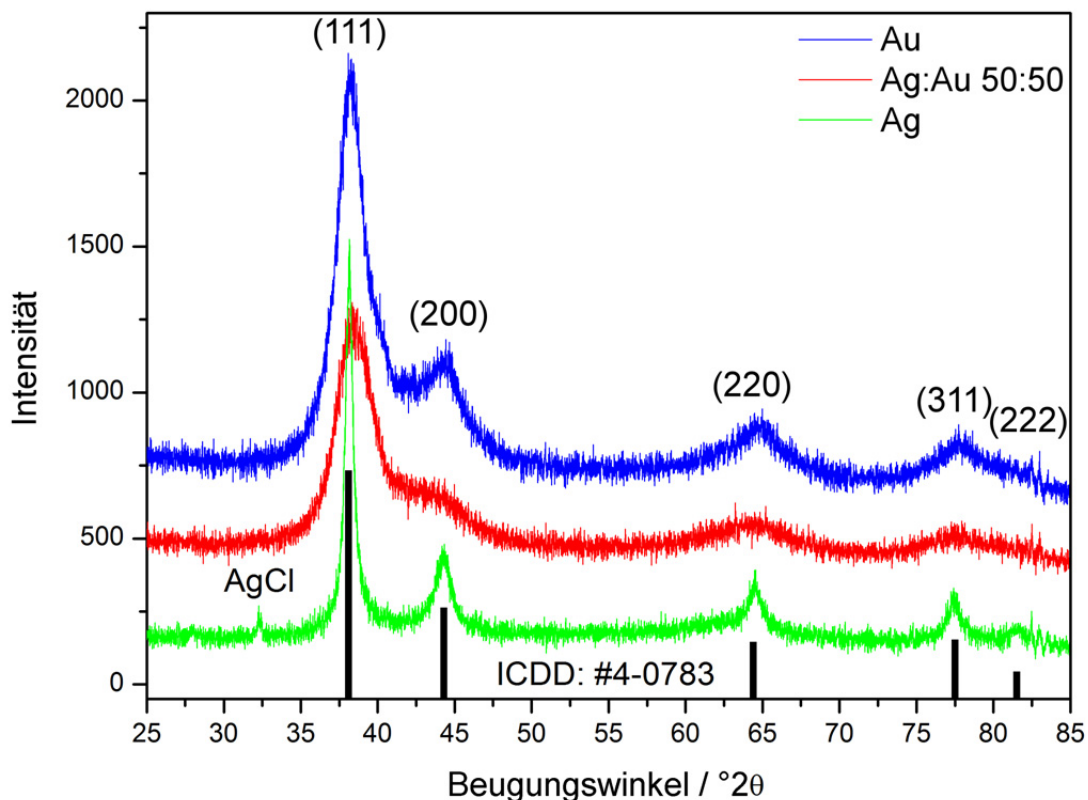
**Abbildung 61:** Auftragung der Maxima der Plasmonenabsorptionsbanden PVP-stabilsierter Ag-Au-Nanopartikel gegen den Molenbruch  $x(\text{Ag})$  mit berechnetem linearen Fit.

#### 4.3.2.1 Untersuchung der Struktur der Ag:Au-PVP-Nanopartikel mittels Röntgenpulverdiffraktometrie

Für eine detaillierte strukturelle Untersuchung der kleinen, mit 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration dargestellten Ag:Au-PVP-Nanopartikel wurden die nanoskopischen Systeme mittels Röntgenpulverdiffraktometrie untersucht.

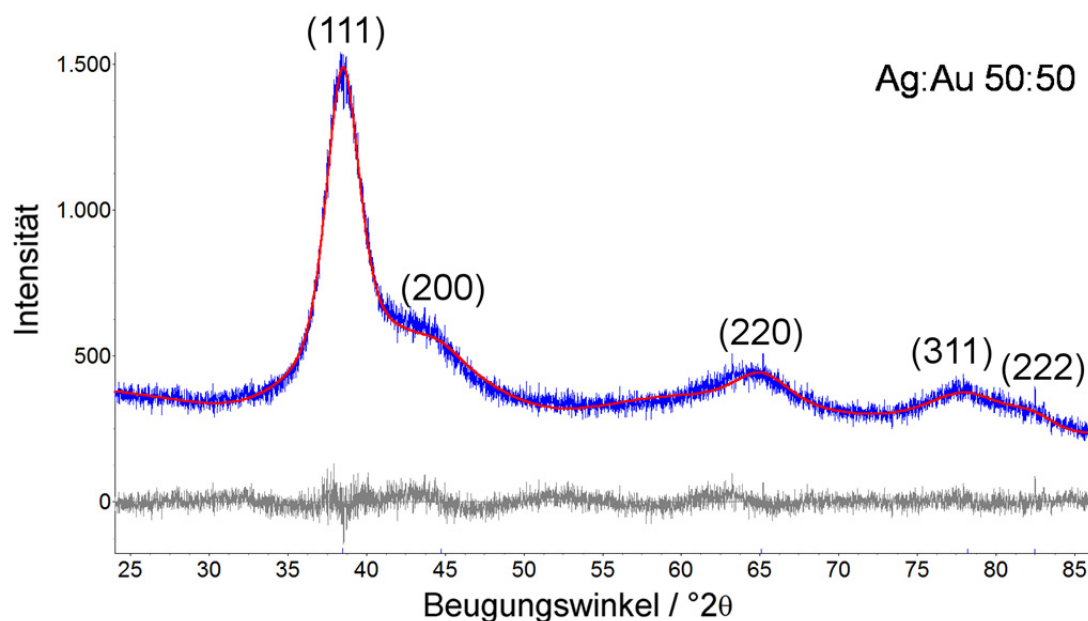
Die aufgenommenen Röntgenpulverdiffraktogramme zeigten, dass sowohl die reinen Ag-PVP- und Au-PVP-Nanopartikel als auch die bimetalischen Ag:Au-PVP-Nanopartikel nanokristallin waren. Die deutlich verbreiterten Reflexe stimmten in ihren Maxima mit den Literaturreflexlagen von Silber und Gold überein. In Abbildung 62 sind drei repräsentative Pulverdiffraktogramme von Ag-, Au- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln abgebildet. Hier ist die Peakverbreiterung deutlich zu erkennen. Neben den prominenten (111)-, (200)-, (220)- und (311)-Reflexen des fcc-Gitters, die in allen Partikelsystemen zugeordnet werden konnten, wurde in manchen

Partikelsystemen mit höherem Silberanteil geringe Mengen von AgCl nachgewiesen. Die AgCl-Spuren entstammen wahrscheinlich noch der Synthese der Nanopartikel und waren trotz dreifacher Zentrifugation und Redispersion nicht zu eliminieren. Dies deutet darauf hin, dass das Silberchlorid wahrscheinlich auch in nanopartikulärer Form vorliegt. Mittels *Rietveld*-Verfeinerung konnte die Kristallitgröße der Partikel ermittelt werden. Als Strukturparameter für die Verfeinerung wurden die in Abbildung 62 gezeigten Werte für Silber aus der ICDD-Datenbank (#4-0783) verwendet.



**Abbildung 62: Repräsentative Röntgenpulverdiffraktogramme von Ag-, Ag:Au-50:50- und Au-Nanopartikeln mit angegebenen Literaturreflexlagen für elementares Ag.**

In Abbildung 63 ist ein repräsentatives Schema einer *Rietveld*-Verfeinerung von Ag:Au-50:50-Nanopartikeln mit Differenzplot dargestellt. Es wird deutlich, dass die Anpassung der Messung an die Modelle mit guter Übereinstimmung vollzogen werden konnte, da im Differenzplot nur kleine Abweichungen zu erkennen sind.



**Abbildung 63: Repräsentative Rietveld-Verfeinerung von Ag:Au-50:50-Nanopartikeln. Oben: Gemessenes Röntgenpulverdiffraktogramm, unten: Differenzplot.**

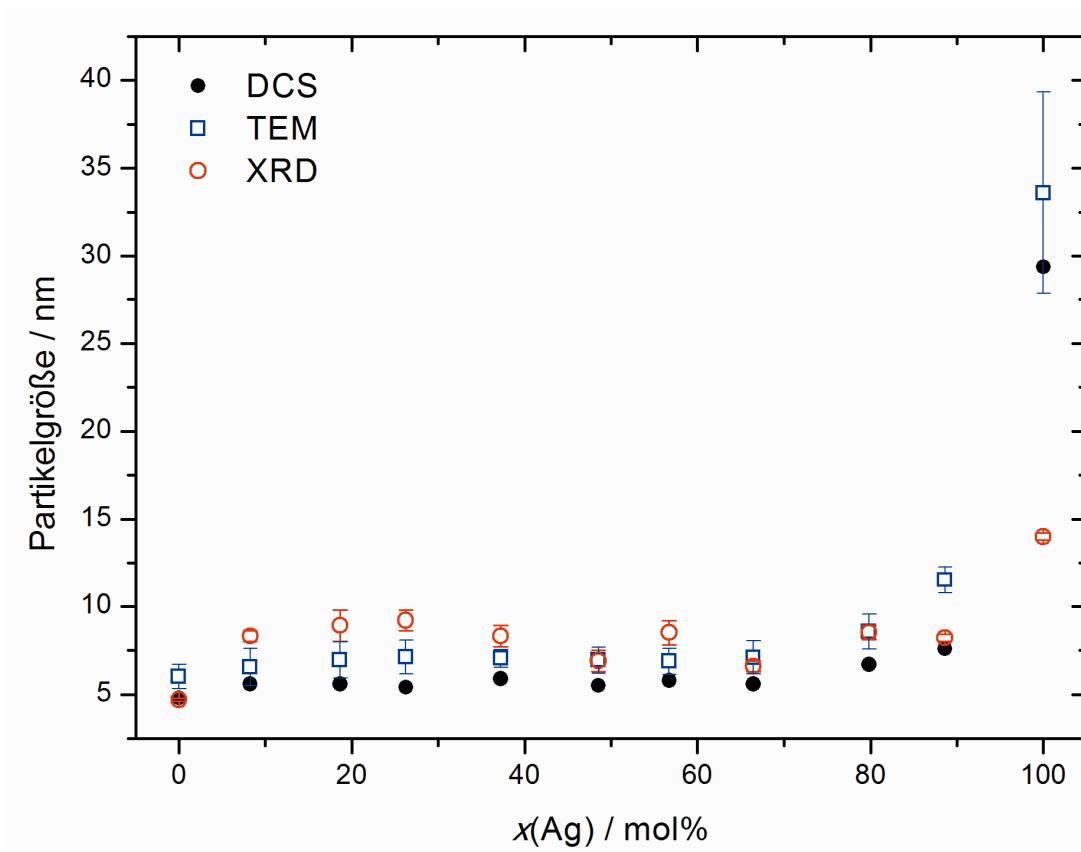
Die mittels *Rietveld*-Verfeinerung aus den Pulverdiffraktogrammen errechneten Kristallitgrößen sind in Tabelle 20 aufgeführt. Unabhängig von der Zusammensetzung der Ag-Au-Nanopartikel wurden Kristallitgrößen zwischen ca. 7 nm und 9 nm errechnet. Für reine Au-Nanopartikel wurde eine Kristallitgröße von 4,7 nm gefunden, für reine Ag-Nanopartikel eine Kristallitgröße von 14 nm. Damit hatten die Au-Nanopartikel kleinere Domänen als die Ag-Au-Nanopartikel, während die Ag-Nanopartikel deutlich größere Domänen aufwiesen. Eine übereinstimmende Beobachtung wurde auch im Zuge von Partikelgrößenanalysen mit TEM und DCS gemacht.

Ein Vergleich von Partikeldurchmessern aus DCS-Messungen und den Kristallitgrößen zeigt eine gute Übereinstimmung für Au- und Ag:Au-PVP-Nanopartikel. Es ist zu beachten, dass die Partikelgröße auf Grund der durch die Polymerhülle bedingten geringeren Dichte in der analytischen Scheibenzentrifugation häufig unterschätzt wird. Dieser Effekt wurde auch in anderen in dieser Arbeit diskutierten Partikelsystemen beobachtet. Die aus TEM-Aufnahmen gewonnenen Informationen über die Partikelgröße decken sich mit den errechneten Kristallitgrößen.

**Tabelle 20: Zusammenstellung der mittels DCS und TEM ermittelten durchschnittlichen Partikelgröße und in XRD-Messungen beobachtete Kristallitgröße.**

Ag:Au / mol%:mol%	<i>D</i> (TEM) / nm	<i>D</i> (DCS) / nm	Kristallitgröße (XRD) / nm
0:100	6,0±0,7	4,8	4,7±0,1
10:90	6,5±1,0	5,5	8,3±0,3
20:80	6,9±1,0	5,4	8,9±0,9
30:70	7,1±1,0	5,5	9,2±0,6
40:60	7,0±0,5	5,6	8,3±0,6
50:50	6,9±0,7	5,7	6,9±0,6
60:40	6,9±0,7	5,5	8,5±0,7
70:30	7,1±0,9	5,3	6,6±0,3
80:20	8,5±1,0	6,8	8,5±0,4
90:10	12±1	8,1	8,2±0,2
100:0	34±6	29	14±1

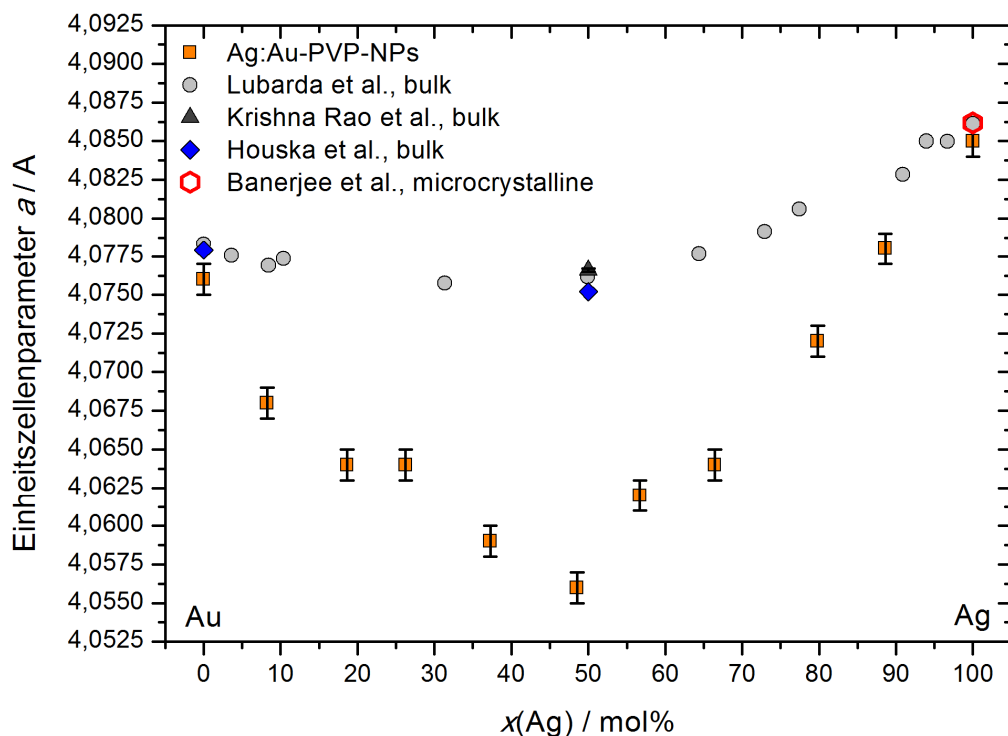
Die Übereinstimmung zwischen durchschnittlicher Partikelgröße und Kristallitgröße ist ein Hinweis auf eine unverzwilligte Struktur der Ag-Au-Nanopartikel. Eine Ausnahme davon bilden die reinen Ag-Nanopartikel. Hier wurde eine Partikelgröße von 34 nm (TEM) bzw. 29 nm (DCS) gemessen, während eine Kristallitgröße von 14 nm berechnet wurde. Dies spricht für eine Verzwillingung der Silberpartikel. Die in Abbildung 59 gezeigten TEM-Aufnahmen untermauern die Beobachtung, da deutlich zu erkennen ist, dass die Ag-Nanopartikel aus 2 - 3 Domänen bestehen, die in einer ihrer Dimensionen im Bereich von 14 nm liegen. In Abbildung 64 ist die Abhängigkeit der Kristallitgröße und der zugehörigen durchschnittlichen Partikelgröße aus DCS und TEM vom Silbergehalt der Nanopartikel dargestellt. Auf dieser Abbildung wird die gute Übereinstimmung der komplementären Messmethoden besonders deutlich. Neben leichten Schwankungen im Verlauf der Graphen ist nur im Falle der reinen Ag-Nanopartikel ein offensichtlicher Unterschied zwischen Partikelgröße und Kristallitgröße zu erkennen.



**Abbildung 64: Durchschnittliche Partikelgröße, ermittelt aus DCS-Messungen, TEM-Aufnahmen und Kristallitgröße, ermittelt aus XRD-Messungen.**

Mit Hilfe von röntgenpulverdiffraktometrischen Aufnahmen der Nanopartikel in Gegenwart von beigemischem  $\text{LaB}_6$ -Standard konnten die Gitterparameter der legierten Ag-Au-Nanopartikel ermittelt werden. Dabei wurde eine starke negative Abweichung von der *Vegard*-Regel, die einen linearen Zusammenhang zwischen den Gitterparametern einer idealen Legierung und ihrer Zusammensetzung beschreibt, festgestellt (Abbildung 65). Da sich Silber ( $2,89 \text{ \AA}$ ) und Gold ( $2,89 \text{ \AA}$ ) in ihren Atomradien minimal unterscheiden, wäre der *Vegard*-Regel entsprechend beim Zulegieren von Silber zu Gold ein gradueller Anstieg der Gitterparameter zu erwarten. Der für die Ag-Au-Nanopartikel gefundene Unterschied zwischen den gemessenen und den theoretischen *Vegard*'schen Parametern betrug bis zu  $-0,024 \text{ \AA}$  im Bereich der Ag:Au-50:50-Nanopartikel. Für vergleichbare Untersuchungen an (mikro)kristallinem legierten Ag:Au-, Ag- und Au-Bulkmaterial wurden zwar ebenfalls leichte negative Abweichungen von der *Vegard*-Regel gefunden, allerdings betrug die maximale Differenz zwischen gemessenen Gitterparametern und den *Vegard*'schen Parametern  $-0,006 \text{ \AA}$ ,

ebenfalls im Bereich einer Zusammensetzung von 50:50 (mol%:mol%).<sup>[123,163]</sup> Für die synthetisierten reinen Ag- und Au-Nanopartikel wurden im Vergleich mit mikrokristallinen Proben ebenfalls kleinere Gitterparameter beobachtet. Diese Abweichungen waren allerdings wesentlich geringer als im Falle der legierten Ag-Au-Nanopartikel. Daher ist es offensichtlich, dass die deutliche Abweichung der Ag:Au-Partikel von den *Vegard*'schen Parametern, die eine Kontraktion des Kristallgitters anzeigt, nicht allein in der nanoskopischen Partikelgröße begründet liegt.

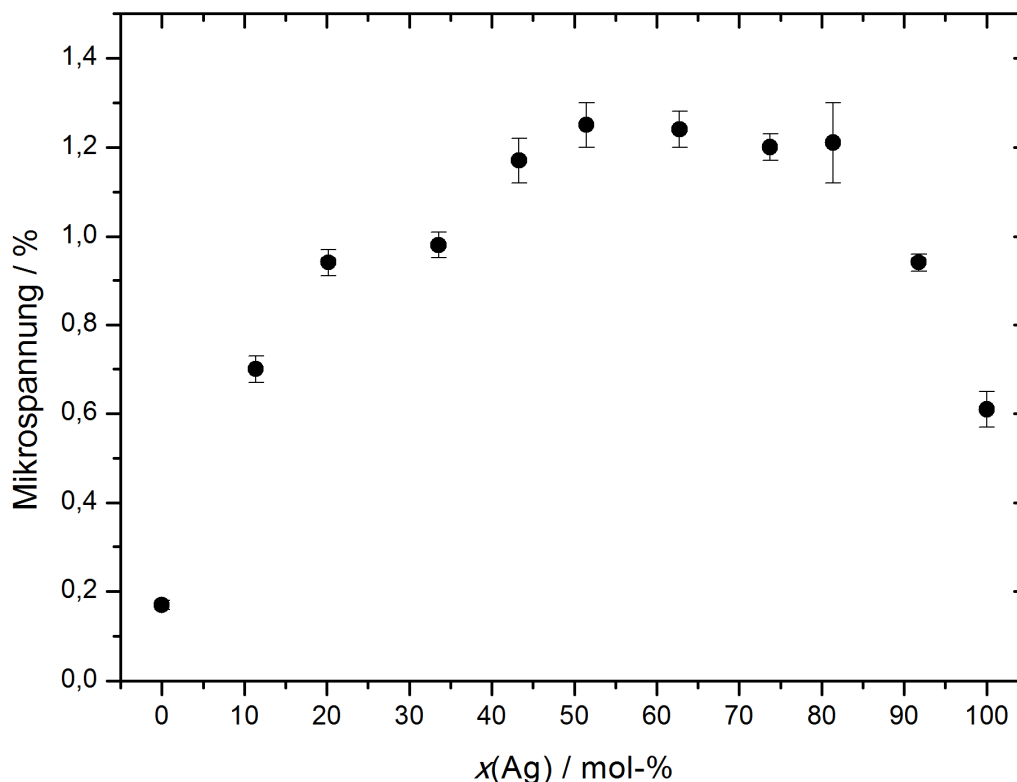


**Abbildung 65: Gitterparameter der Ag-Au-Nanopartikel in Abhängigkeit von der Zusammensetzung mit Literaturwerten von Bulkmaterialien in bestimmten Kompositionen.**

Die Verkleinerung der Gitterparameter der legierten Ag-Au-Nanopartikel zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Partikel mit gradueller Abnahme zwischen Ag:Au-10:90 und Ag:Au-50:50 und darauffolgendem nahezu linearen Anstieg hin zu Ag:Au-90:10. Die Komprimierung der Einheitszelle führt zu der Ausbildung von Mikrostress im Kristallgitter. Dieser konnte ebenfalls aus den pulverdiffraktometrischen Daten berechnet werden. In Abbildung 66 ist der Mikrostress in Abhängigkeit vom Silberanteil der Nanopartikel aufgetragen. Der in der Auftragung



ersichtliche Verlauf weist eine maximale Mikrospannung im Bereich einer Zusammensetzung von Ag:Au-50:50 auf. Dies korrespondiert mit dem in Abbildung 65 gezeigten Trend der Gitterparameter.



**Abbildung 66: Mittels XRD detektierte Mikrospannung in den Ag-Au-Nanopartikeln.**

In einer Untersuchung der Gitterparameter von lasergenerierten legierten Ag:Au-75:25-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-25:75-Nanopartikeln von *Petkov et al.* mit Hilfe von PDF-Analysen (PDF - *atomic pair distribution function*) wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht.<sup>[164]</sup> Allerdings wurden bei direkt nach der lasergestützten Synthese vermessenen Partikeln eine lineare und daher der *Vegard*-Regel gehorchende Abhängigkeit der Gitterparameter gefunden. Nach thermischer Behandlung der Nanopartikel unter  $\text{O}_2$ - und  $\text{H}_2$ -Atmosphäre wurde dann eine deutliche Verkleinerung der Gitterparameter mit einer maximalen Verringerung um  $-0,018 \text{ \AA}$  bei Ag:Au-50:50-Nanopartikeln beobachtet.<sup>[164]</sup> Die hier diskutierten Abweichungen einer Legierung von der *Vegard*-Regel werden häufig mit Veränderungen der elektronischen Struktur der Gitteratome assoziiert.<sup>[123]</sup> Ein gängiges Modell zur Beschreibung dieser Vorgänge ist das Bindungsmodell nach *Pauling*,

nach dem in einer heterogenen metallischen Atompaarbindung das elektronegravere Element ein Bindungselektron des elektropositiveren Bindungspartners per Ladungsübertragung zu sich zieht. Durch die nun höhere Ladungsdichte in der Elektronenwolke wird diese stärker vom Atomkern angezogen, wodurch sich der Atomradius des elektronegativeren Metalls verringert.<sup>[165]</sup> Petkov et al. fanden durch PDF-Analysen zum *Pauling*-Modell gegensätzliche Verhältnisse in der nanoskopischen Ag:Au-Legierung, in der für das elektropositivere Silber beim Legieren in das Goldgitter eine Verkleinerung des Atomradius um bis zu 0,03 Å (Ag:Au-25:75) beobachtet wurde.<sup>[164]</sup> Auf Grund der Vergleichbarkeit der beobachteten Abweichungen von der *Vegard*-Regel, ist es möglich, dass die Komprimierung des Kristallgitters der in dieser Arbeit synthetisierten Ag:Au-PVP-Nanopartikel auf einen ähnlichen Effekt zurückzuführen ist.

### **4.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen des Einflusses der Reduktionsmittelkonzentrationen und der Charakterisierung von 7 nm-großen Ag:Au-PVP-Nanopartikeln**

Um die Darstellung von bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln über die Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  mit einem Gemisch aus Citrat und Tannin auf eine mögliche Größenkontrolle hin zu untersuchen, wurde die Reduktionsmittelkonzentration variiert. Dabei zeigte sich, dass im Falle von Ag:Au-50:50-Nanopartikeln die 0,75-fache Reduktionsmittelkonzentration zu einer Vergrößerung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers von 11 nm auf 16 nm (DCS, Anzahl) führte. Mit der 1,5-fachen Reduktionsmittelkonzentration ergab sich eine Verringerung des Partikeldurchmessers auf 8 nm (DCS, Anzahl). Diese Beobachtungen entsprachen den Erwartungen und deckten sich mit vergleichbaren in der Literatur beschriebenen Synthesen.<sup>[51,166]</sup> Mit 1,5-facher Reduktionsmittelmenge wurden legierte Ag-Au-Nanopartikel in neun Zusammensetzungen und reine Ag- und Au-Nanopartikel dargestellt. Aus AAS-Messungen war ersichtlich, dass die theoretischen Zusammensetzungen nahe an den experimentell ermittelten Werten lagen. Die mit PVP umfunktionalisierten Ag:Au-Partikel wiesen entgegen den Beobachtungen für die Standard-Citrat/Tannin-Synthese in DLS- und DCS-

Messungen eine von der Zusammensetzung unabhängige Partikelgröße von 10 - 12 nm (DLS, Anzahl) bzw. 5,4 nm - 5,7 nm (DCS, Anzahl) auf. Die reinen Ag-Partikel lagen mit 22 nm (DLS, Anzahl) bzw. 17 nm (DCS, Anzahl) deutlich darüber, während reine Au-Nanopartikel etwas kleiner waren (9 nm, DLS, Anzahl; 4,5 nm, DCS, Anzahl). UV-Vis-Messungen belegten einen hohen Legierungscharakter der Partikel. Zur Untersuchung der Struktur der Ag:Au-Partikel wurden TEM-Aufnahmen angefertigt und die Partikel mittels Röntgenpulverdiffraktometrie und anschließender *Rietveld*-Verfeinerung analysiert. Es zeigte sich, dass die legierten Ag:Au-Partikel nanokristallin waren und keine Verzwillingung aufwiesen. Dies konnte durch übereinstimmende Kristallitgrößen und Partikelgrößen belegt werden. Im Zuge der *Rietveld*-Verfeinerung konnte nachgewiesen werden, dass die Gitterparameter der Ag-Au-Nanopartikel nicht der *Vegard*-Regel gehorchen, sondern dass negative Abweichungen mit einem Maximum von  $-0,024 \text{ \AA}$  bei Ag:Au-50:50-Nanopartikeln auftraten. Diese Komprimierung der Einheitszelle führte zu deutlichen Mikrospannungen im Gitter der Nanopartikel, die ebenfalls ermittelt wurden.

#### 4.4 Zellbiologische Untersuchungen mit bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln

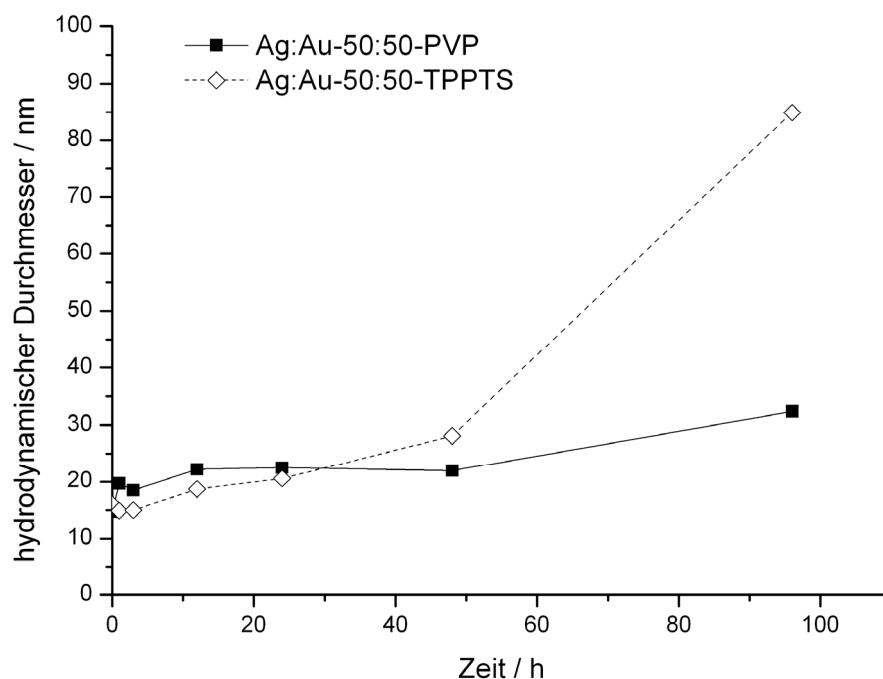
Ein wichtiger Aspekt der Arbeit war die Untersuchung von zellbiologischen Effekten der Ag-Au-Nanopartikel. Dabei sollte vor allem eine zusammensetzungsabhängige Toxizität untersucht werden, da ein Zusammenhang der biologischen Wirkung der Partikel und deren Silbergehalt erwartet wurde. In der Literatur wurden bisher nur wenige zellbiologische Studien mit bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln veröffentlicht.<sup>[134,140,141]</sup> In diesen Studien wurde jedoch jeweils eine auffällige Abweichung vom hypothetischen linearen Zusammenhang der Zelltoxizität und dem Silbergehalt der Partikel herausgearbeitet. Durch Zulegieren von Goldanteilen in Ag-Au-Nanopartikel wurde jeweils eine Reduktion der an Hand des Silberanteils zu erwartenden silberinduzierten Toxizität beobachtet.

Für zellbiologische Untersuchungen wurden ausschließlich aufgereinigte Partikelsysteme verwendet, um einen potentiellen toxischen Effekt von Nebenprodukten auszuschließen. Um einen toxischen Effekt des Liganden

abzuschätzen, wurden sowohl PVP- als auch TPPTS-stabilisierte Ag:Au-50:50-Nanopartikel hinsichtlich der zellbiologischen Wirkung auf hMSCs untersucht. Da ein partikelgrößenabhängiger Toxizitätseffekt nach Möglichkeit ausgeschlossen werden sollte, wurden für die folgenden zusammensetzungsabhängigen Toxizitätsstudien an transformierten humanen Cervixepithelzellen (HeLa-Zellen) und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) die mittels 1,5-facher Reduktionsmittelkonzentration PVP-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikel verwendet, da diese nur einen sehr geringen Größenunterschied aufwiesen. Die Zellkulturuntersuchungen wurden von Frau Svitlana Chernousova und Frau Dr. Christina Sengstock durchgeführt.

### **4.4.1 Stabilität von Ag:Au-PVP und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln in zellbiologischem Medium**

Um die Stabilität der Ag-Au-Nanopartikel in biologischen Medien zu untersuchen, wurden Ag:Au-50:50-Nanopartikel mit PVP- und TPPTS-Funktionalisierung mit einer Gesamtmetallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  in RPMI (*Roswell Memorial Park Institute* Zellkulturmedium) mit 10% fötalem Kälberserum (*fetal calf serum* - FCS) inkubiert. Die Stabilität der Nanopartikel wurde über einen Zeitraum von 90 Stunden mit Hilfe von DLS-Messungen analysiert. Dabei zeigte sich, dass der hydrodynamische Durchmesser der Nanopartikel unabhängig vom Liganden direkt nach Inkubation leicht anstieg, was wahrscheinlich auf die Ausbildung einer Proteincorona durch das FCS zurückzuführen ist. Nach einem Zeitraum von 48 h zeigten sich leichte Agglomerationserscheinungen, die für die TPPTS-stabilisierten Nanopartikel deutlicher zunahmen. Nach 96 h waren die Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikel stark agglomeriert was durch den Anstieg des anzahlgewichteten hydrodynamischen Durchmessers von 14 nm auf 85 nm deutlich wurde (Abbildung 67). PVP-stabilisierte Ag:Au-50:50-Nanopartikel zeigten nach 96 h einen von 15 nm auf 32 nm angestiegenen hydrodynamischen Durchmesser auf, was für paarweise Zusammenlagerung der Nanopartikel spricht (Abbildung 67).



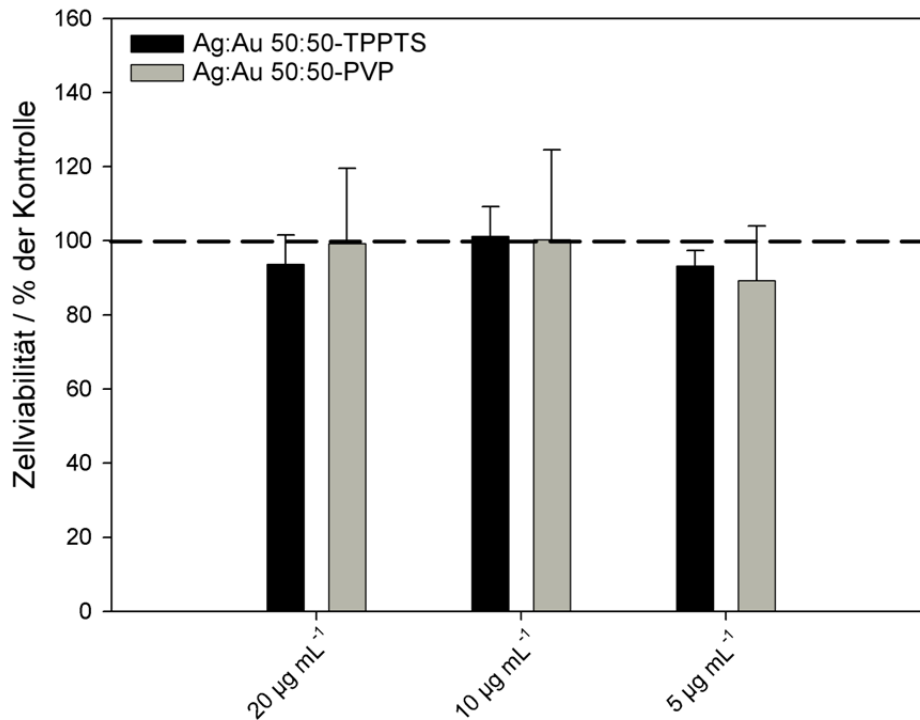
**Abbildung 67: Stabilität von 11 nm Ag:Au-50:50-PVP- und Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln in RPMI + 10% FCS, gemessen mittels DLS**

Für aussagekräftige zellbiologische Untersuchungen an Nanopartikeln ist es entscheidend, dass die Partikel im biologischen Medium dispergiert und nicht mikropartikulär agglomeriert vorliegen.<sup>[77,106,167]</sup> Die Analyse der Stabilität von Ag:Au-50:50-PVP- und -TPPTS-Nanopartikel in RPMI + 10% FCS zeigte, dass die PVP-stabilisierten Nanopartikel im relevanten Zeitraum nur minimale Agglomerationserscheinungen aufwiesen. TPPTS-stabilisierte Nanopartikel schienen stärker zu agglomerieren, jedoch wurden keine mikroskopischen Agglomerate detektiert. Die Stabilität der Ag:Au-50:50-Nanopartikel kann mit beiden Liganden als ausreichend für zellbiologische Untersuchungen erachtet werden.

#### **4.4.2 Zelltoxizität von PVP- und TPPTS-funktionalisierten 11 nm-großen Ag:Au-50:50-Nanopartikeln gegenüber hMSCs**

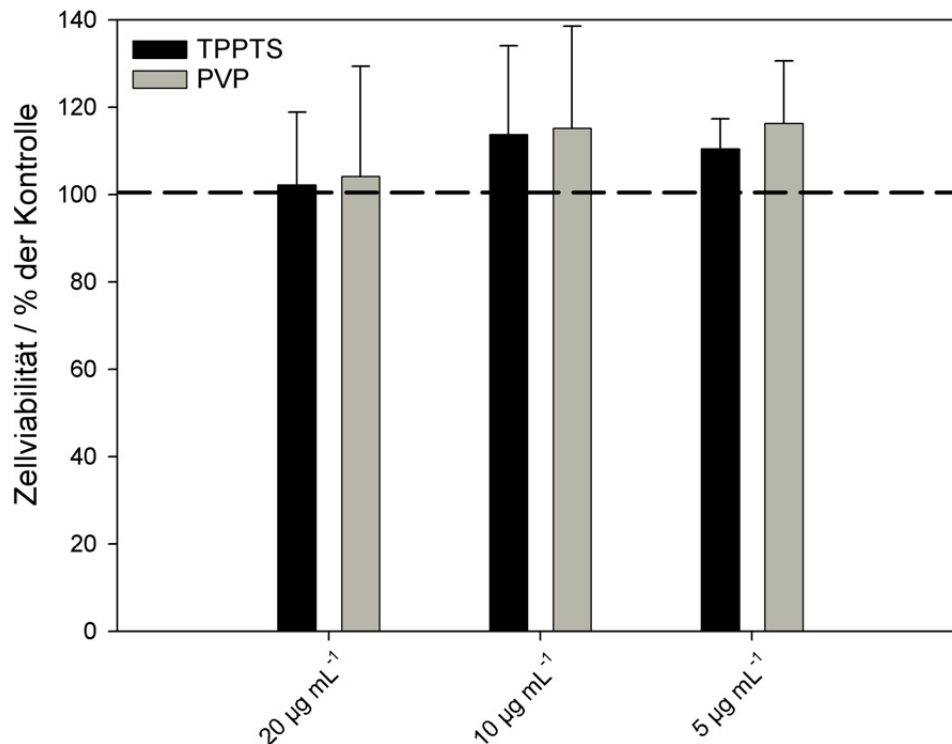
Zur Untersuchung eines Effekts des Liganden auf die Toxizität der Partikel wurden hMSCs mit PVP- und TPPTS-funktionalisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln aus der Standardsynthese mit Citrat/Tannin als Reduktionsmittel ( $d \approx 11$  nm) inkubiert. Die verwendeten Gesamtmetallkonzentrationen betrugen  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . inkubiert. Eine Analyse der Zelltoxizität mittels Calcein-

Acetoxymethylester-Anfärbung zeigte nach 24 h Inkubation der hMSCs mit den Partikeln keinen signifikanten toxischen Effekt für alle verwendeten Gesamtmetallkonzentrationen (siehe Abbildung 68).



**Abbildung 68: Einfluss von PVP- und TPPTS-funktionalisierten 11 nm Ag:Au-50:50-Nanopartikeln auf die Viabilität von hMSCs nach 24 h Inkubation. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

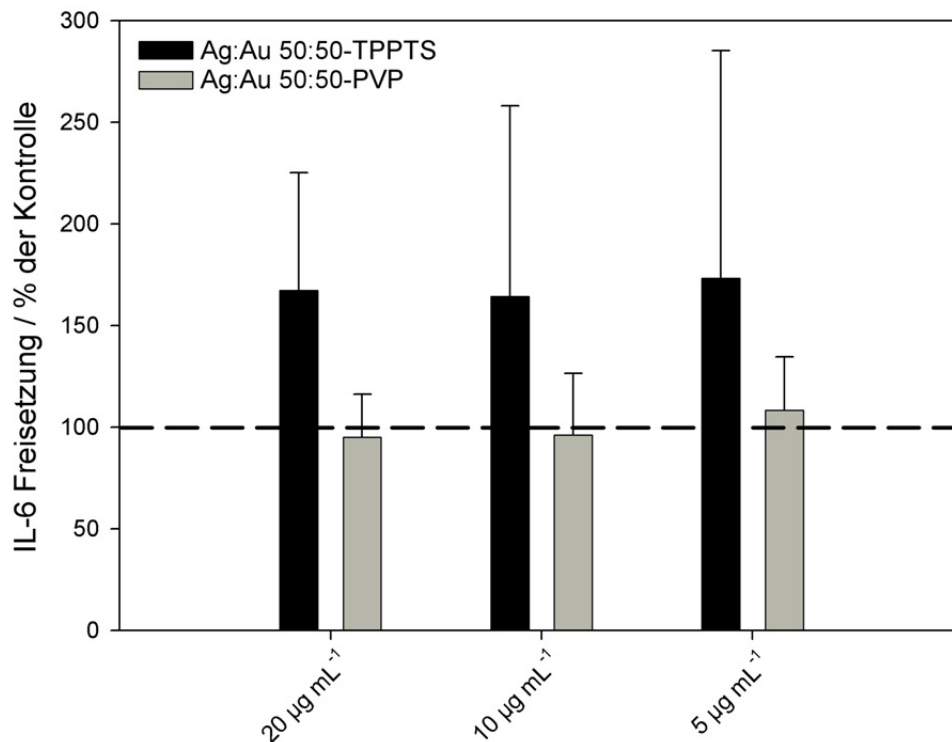
Auch nach 7 Tagen Inkubation konnte kein signifikanter toxischer Effekt festgestellt werden. Im Falle der mittleren und niedrigen verwendeten Metallkonzentrationen von 10 µg mL<sup>-1</sup> und 5 µg mL<sup>-1</sup> wurde sogar eine geringe Zunahme der Zellviabilität beobachtet (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Einfluss von PVP- und TPPTS-funktionalisierten 11 nm Ag:Au-50:50-Nanopartikeln auf die Viabilität von hMSCs nach 7 d Inkubation. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

Die Inkubation von hMSCs mit unterschiedlich funktionalisierten ca. 11 nm-großen Ag:Au-50:50-Nanopartikeln über einen Zeitraum von 7 Tagen zeigte, dass die Nanopartikel überraschenderweise trotz eines Silberanteils von 50 mol% unabhängig von ihrer Funktionalisierung keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübten.

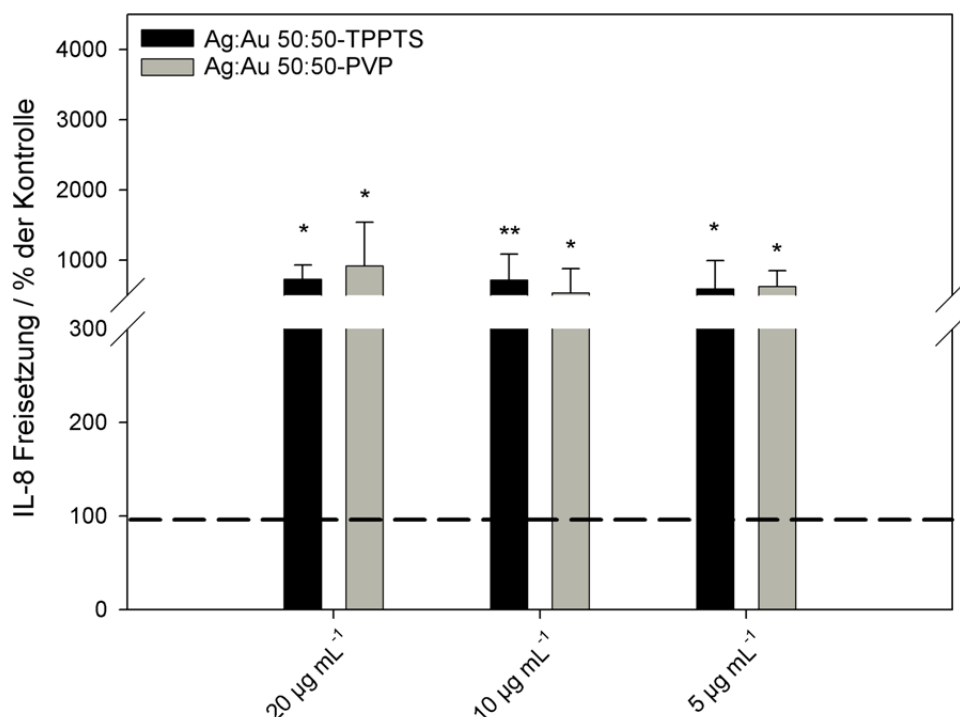
Weiterhin wurde während der Inkubation die Cytokinfreisetzung von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) untersucht und als Signal für eine Zellaktivierung interpretiert. Nach 24 stündiger Inkubation der hMSCs mit den Ag-Au-Nanopartikeln konnte unabhängig von der Funktionalisierung der Nanopartikel und der Metallkonzentration keine signifikante Freisetzung von Interleukin-6, einem entzündungsregulierenden Cytokin, beobachtet werden (Abbildung 70).



**Abbildung 70: Einfluss von PVP- und TPPTS-funktionalisierten 11 nm Ag:Au-50:50-Nanopartikeln auf die IL-6-Freisetzung von hMSCs. Die gestrichelte Linie gibt die IL-6-Freisetzung der unbehandelten Kontrolle an.**

Die Freisetzung von Interleukin-8, ebenfalls ein pro-inflammatorisches Cytokin, wurde durch die Inkubation mit Ag-Au-Nanopartikeln unabhängig von Funktionalisierung und Metallkonzentration signifikant erhöht (Abbildung 71). Diese Beobachtung könnte auf eine durch Silberionen induzierte Aktivierung von Signalpfaden der Zellen hindeuten, die in verschiedenen Studien mit Ag-Nanopartikeln und unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen wurde.<sup>[168]</sup> Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Inkubation von peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMCs) mit reinen Ag-Nanopartikeln gefunden.<sup>[105]</sup>



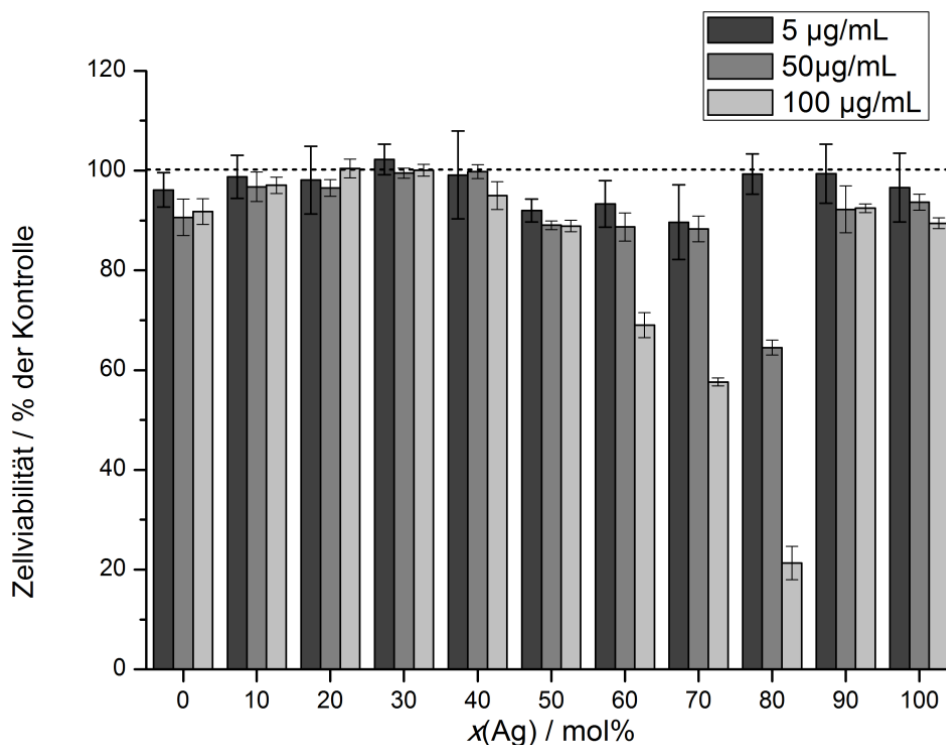


**Abbildung 71:** Einfluss von PVP- und TPPTS-funktionalisierten Ag:Au-50:50-Nanopartikeln auf die IL-8-Freisetzung von hMSCs. Sternchen (\*) markieren die Signifikanz gegenüber der Kontrolle (gestrichelte Linie).

#### 4.4.3 Zelltoxizität von PVP-funktionalisierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber HeLa-Zellen

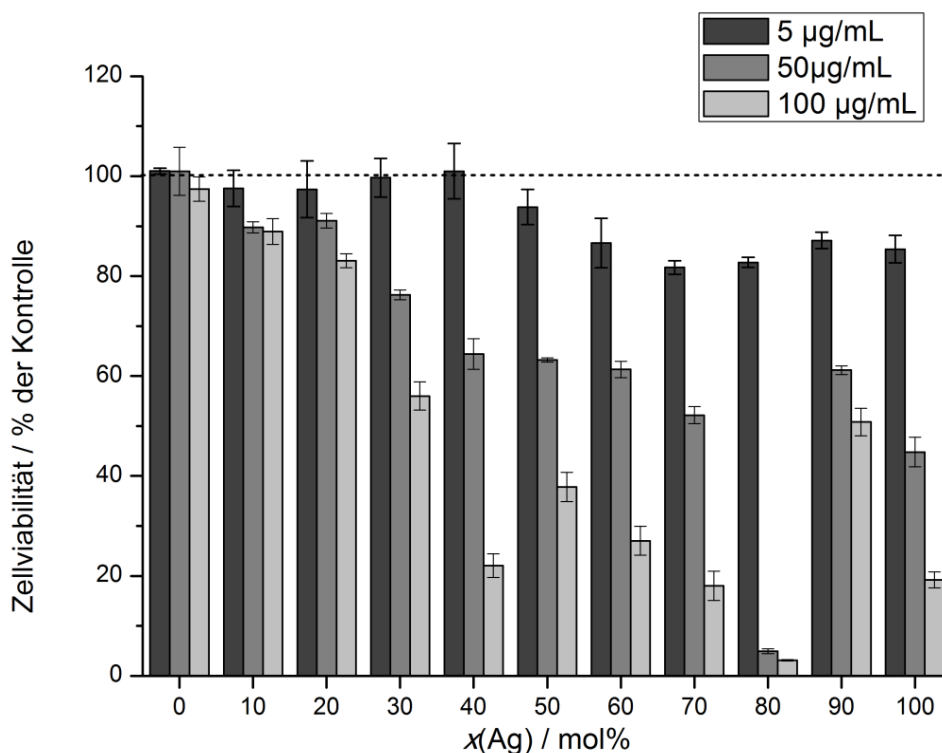
Zellbiologische Experimente mit bimetalischen ~7 nm Ag:Au-PVP-Nanopartikeln in neun verschiedenen Zusammensetzungen und drei verschiedenen Gesamtmetallkonzentrationen (5 µg mL<sup>-1</sup>, 50 µg mL<sup>-1</sup> und 100 µg mL<sup>-1</sup>) an HeLa-Zellen sollten eine potentielle zusammensetzungsabhängige Toxizität untersuchen. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu erleichtern, wurden mit identischen Synthesen dargestellte reine Ag-PVP- und Au-PVP-Nanopartikel verwendet. In Abbildung 72 ist die mittels MTT-Test ermittelte Zellviabilität der HeLa-Zellen nach 5 h Inkubation mit den zum Vergleich verwendeten Ag- und Au-Nanopartikeln sowie den legierten Ag-Au-Nanopartikeln gezeigt. Es ist zu erkennen, dass Partikel mit einem Silberanteil von über 50 mol% nach 5 h einen toxischen Effekt auf die HeLa-Zellen ausübten. Erwartungsgemäß sank die Viabilität der Zellen innerhalb einer Partikelsorte bei steigender Metallkonzentration. Auffällig war, dass Ag:Au-80:20-PVP-Nanopartikel eine sehr hohe Toxizität aufwiesen, die im

Fälle der höchsten verwendeten Metallkonzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  deutlich stärker war als die von Partikeln der ähnlichen Zusammensetzung Ag:Ag-Au-70:30, Ag:Ag-Au-90:10 oder von reinen Ag-Nanopartikeln.



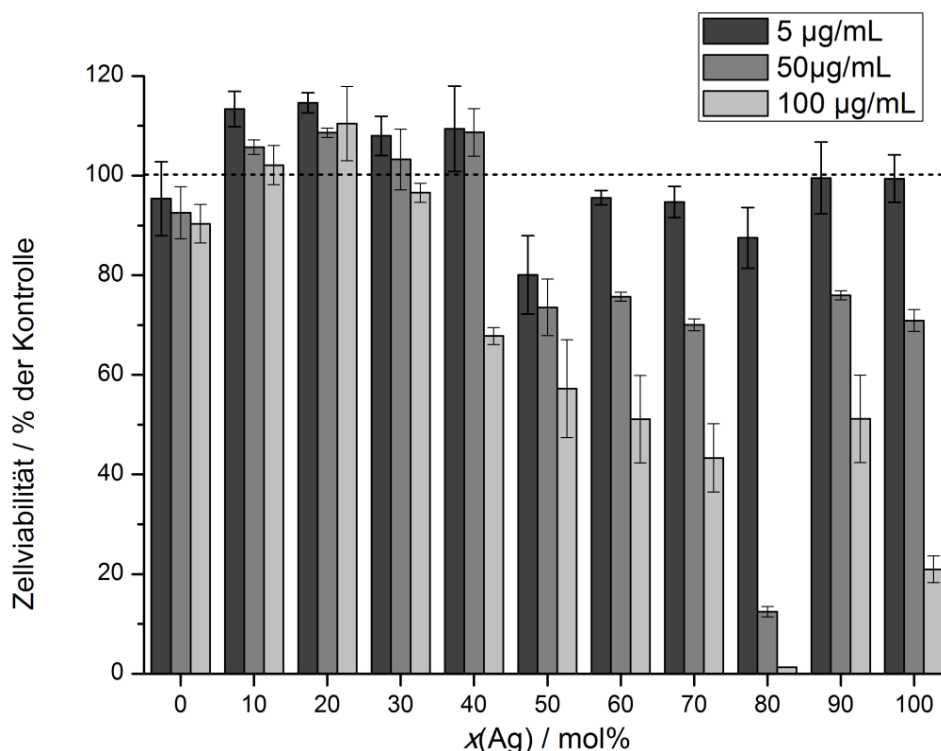
**Abbildung 72: Viabilität von HeLa-Zellen nach 5 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

Nach 24 h Inkubation war bei allen legierten Nanopartikeln eine konzentrationsabhängige Toxizität zu beobachten (Abbildung 73). Im Falle der kleinsten verwendeten Gesamtmetallkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  war die Toxizität nur sehr gering, bei einer Metallkonzentration von  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  hingegen wurde teilweise eine Zellviabilität von deutlich unter 50% ermittelt. Die reinen Au-PVP-Nanopartikel hatten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Viabilität der HeLa-Zellen. Der nicht-lineare Trend in der Zelltoxizität mit einem Minimum an Zellviabilität bei Ag:Ag-Au-80:20-Nanopartikeln war nach 24 h noch deutlicher ausgeprägt mit einer Viabilität unter 10% für Metallkonzentrationen von 50 und  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Abbildung 73: Viabilität von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

Nach 72 h Inkubation hatte die Zellviabilität im Falle von reinen Au- und Ag-Au-Nanopartikeln mit hohem Goldanteil zugenommen und lag teilweise oberhalb von 100%. Ein toxischer Effekt war ausschließlich für Partikel ab 50 mol% Silbergehalt festzustellen (Abbildung 74). Hier zeigte sich wiederum eine mit den vorherigen Messungen übereinstimmende konzentrations- und zusammensetzungsabhängige Toxizität. Während die geringste verwendete Metallkonzentration nahezu keine Auswirkungen auf die Zellviabilität zu haben schien, zeigten Metallkonzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  für Partikel mit einem Silbergehalt von über 50 mol% einen teils sehr starken Effekt. Auch nach 72 h wurde die maximale Toxizität bei Ag:Au-80:20-PVP-Nanopartikeln gefunden.

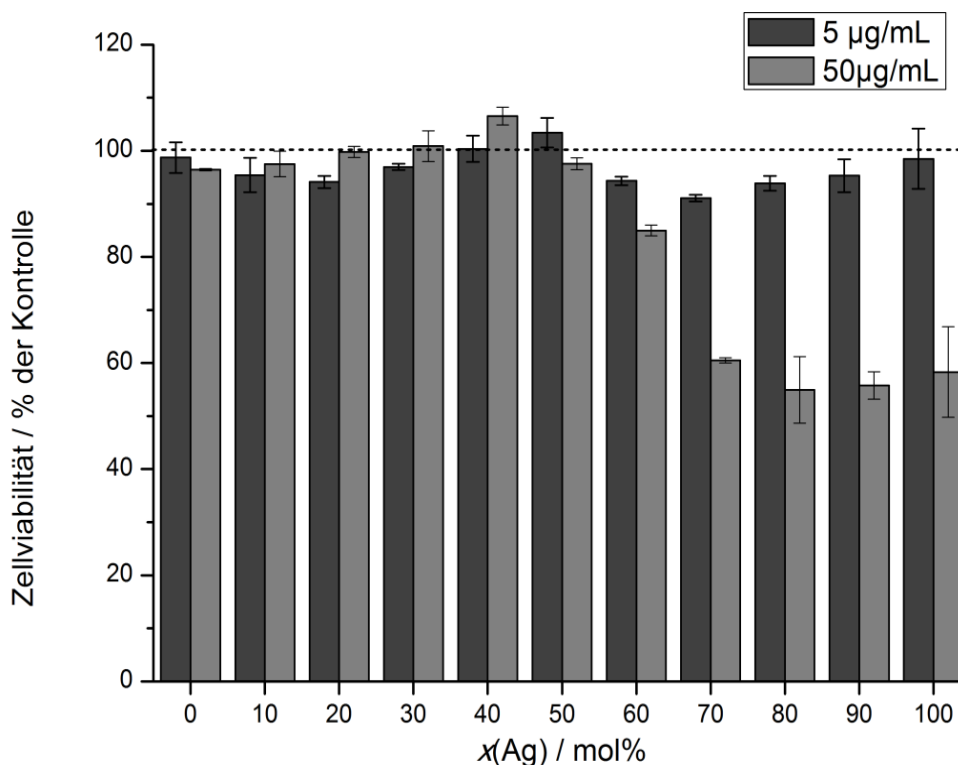


**Abbildung 74:** Viabilität von HeLa-Zellen nach 72 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.

### 4.4.4 Zelltoxizität von PVP-funktionalisierten 7 nm-großen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber hMSCs

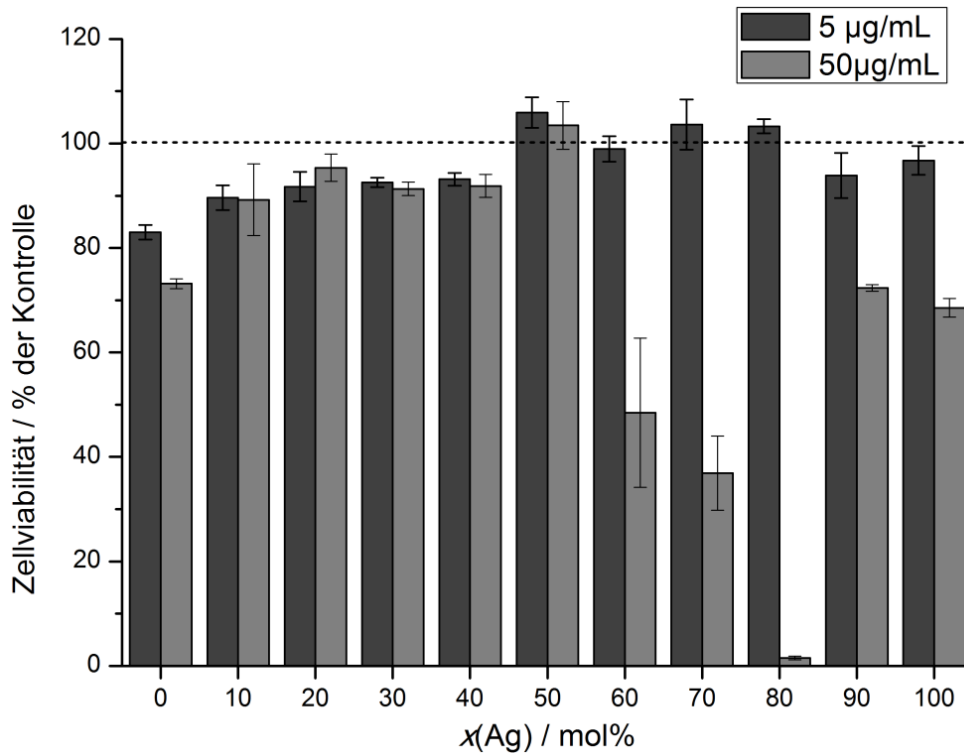
Zusätzlich zu zellbiologischen Experimenten mit HeLa-Zellen wurden hSMCs mit den bimetallicen  $\sim 7$  nm Ag:Au-PVP-Nanopartikeln in neun verschiedenen Zusammensetzungen und zwei verschiedenen Gesamtmetallkonzentrationen ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inkubiert. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu erleichtern, wurden mit identischen Synthesen dargestellte reine Ag-PVP- und Au-PVP-Nanopartikel verwendet.

Nach 5 h Inkubation zeigte sich bei einer Metallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ein toxischer Effekt für Ag-Au-Nanopartikel mit Silbergehalten oberhalb von 50 mol%. Reine Ag-Nanopartikel wiesen eine ähnliche Toxizität auf. Reine Au-Nanopartikel und Nanopartikel mit einem Silbergehalt von unter 60 mol% hatten keinen Einfluss auf die Zellviabilität. In Abbildung 75 ist die mittels MTT-Test ermittelte Zellviabilität der hMSCs nach 5 h Inkubation dargestellt.



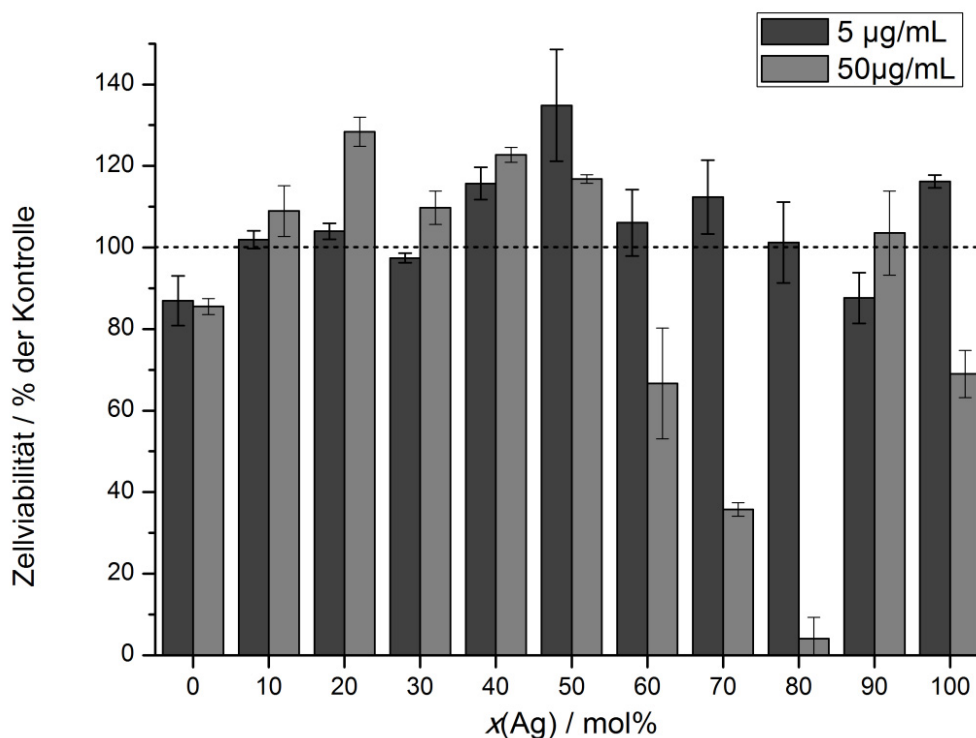
**Abbildung 75: Viabilität von hMSCs nach 5 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

Nach 24 h Inkubation war ein geringer toxischer Effekt von reinen Au-Nanopartikeln sowie von Nanopartikeln mit Silbergehalten zwischen 10 und 40 mol% zu erkennen. Bei einer Metallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  zeigten bimetallische Partikel oberhalb eines Silbergehaltes von 50 mol% teils sehr starke Toxizität mit einem Maximum bei Ag:Au-80:20. Reine Ag- und Ag:Au-90:10-Nanopartikel zeigten einen wesentlich geringeren Effekt (Abbildung 76). Der nichtlineare Zusammenhang zwischen Toxizität und Silbergehalt ähnelte den Beobachtungen, die in zellbiologischen Untersuchungen mit HeLa-Zellen gemacht wurden.



**Abbildung 76: Viabilität von hMSCs nach 24 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

Nach 72 h Inkubation zeigte sich ein den Untersuchungen an HeLa-Zellen ähnlicher Verlauf der Zellviabilität. Auch bei den hMSCs wurden nach 24 h teilweise Viabilitäten über 100% gemessen (Abbildung 77). Im Falle der verwendeten Metallkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde nahezu keine Toxizität mehr gefunden. Die maximale Toxizität wurde bei einer Metallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  der Ag:Au-80:20-Nanopartikeln gefunden, mit einer Zellviabilität von unter 10%. Damit ähnelte der nicht-lineare Verlauf zwischen Toxizität und Silbergehalt mit einem deutlichen Minimum bei Nanopartikeln mit einem Gehalt von 80 mol% Silber dem beobachteten Trend aus den Zellexperimenten mit HeLa-Zellen.



**Abbildung 77:** Viabilität von hMSCs nach 72 h Inkubation mit PVP-funktionalisierten legierten 7 nm Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.

#### 4.4.5 Zusammenfassung der zellbiologischen Untersuchungen von Ag:Au-PVP- und Ag:Au-TPPTS-Nanopartikeln aus Synthesen mit Citrat und Tannin

In den zellbiologischen Untersuchungen an Ag-Au-Nanopartikeln zeigte sich, dass eine Inkubation von hMSCs mit PVP- und TPPTS-stabilisierten 11 nm Ag:Au-50:50-Nanopartikeln über 7 Tage unabhängig von der Funktionalisierung bei Gesamtmetallkonzentrationen von bis zu  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  keine Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen hatte. Jedoch wurde als Reaktion auf die Exposition gegenüber der Nanopartikel das pro-inflammatorische Cytokin IL-8 freigesetzt. Weitergehende Toxizitätsstudien von  $\sim 7$  nm Ag:Au-PVP-Nanopartikeln in neun Zusammensetzungen mit HeLa-Zellen und hMSCs zeigten keinen linearen Zusammenhang zwischen Toxizität und Silbergehalt der Ag:Au-PVP-Nanopartikel. Die Toxizität der legierten Nanopartikeln bis zu einem Silbergehalt von 50 mol% war deutlich geringer als an Hand des Silberanteils zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte auf einen Legierungseffekt zurückzuführen sein, der durch eine

Passivierung des Silbers durch das zulegierte Gold die Freisetzung von Silberionen, der in der Literatur beschriebenen toxischen Spezies von silberenthaltenden Nanopartikelspezies,<sup>[104,107,109,111]</sup> verlangsamt oder reduziert. In vergleichbaren Studien mit lasergenerierten legierten Ag-Au-Nanopartikeln an Cumulus-Oozyt-Komplexen, Spermatozoen und humanen Gingivafibroblasten wurde auf Grund ähnlicher Beobachtungen ebenfalls ein passivierender Effekt des Goldes diskutiert.<sup>[134,141]</sup> Im Unterschied zu den genannten Studien wurde mit den in dieser Arbeit verwendeten Ag-Au-Nanopartikeln in den durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen eine maximale Toxizität bei einer Zusammensetzung von Ag:Au-80:20 gefunden. Während die Toxizität gegenüber beiden Zelltypen, HeLa und hMSCs, bei den jeweils höchsten verwendeten Metallkonzentrationen der Ag:Au-80:20-Nanopartikel nahezu 100 % erreichte, erwiesen sich Ag:Au-90:10-Nanopartikel und reine Ag-Nanopartikel als wesentlich weniger toxisch. Dies könnte mit der, im Vergleich zu den Ag:Au-80:20-Nanopartikeln, leicht erhöhten Partikelgröße und der inhomogenen Zusammensetzung der Partikel zu erklären sein. Die im Vergleich zu den bimetallicischen Nanopartikeln deutlich größeren Ag-Nanopartikel könnten auf Grund ihrer geringeren Oberflächenenergie eine langsamere Freisetzungskinetik von  $\text{Ag}^+$ -Ionen aufweisen, was die verringerte Toxizität erklären könnte. Gleichzeitig zeigte sich in beiden Studien, dass Nanopartikel mit hohem Goldanteil nahezu keinen toxischen Effekt auf die Zellen ausübten und beide Zelltypen nach 72 h hohe Viabilitätswerte aufwiesen. Eine Zunahme in der Viabilität auf über 100% bei einigen Partikelsorten mit hohem Goldanteil stimmt mit Beobachtungen überein, die in zellbiologischen Untersuchungen mit reinen Goldnanopartikeln durchgeführt wurden.<sup>[77,125]</sup>

#### **4.5 Ultrakleine bimetallicische Silber-Gold Nanopartikel**

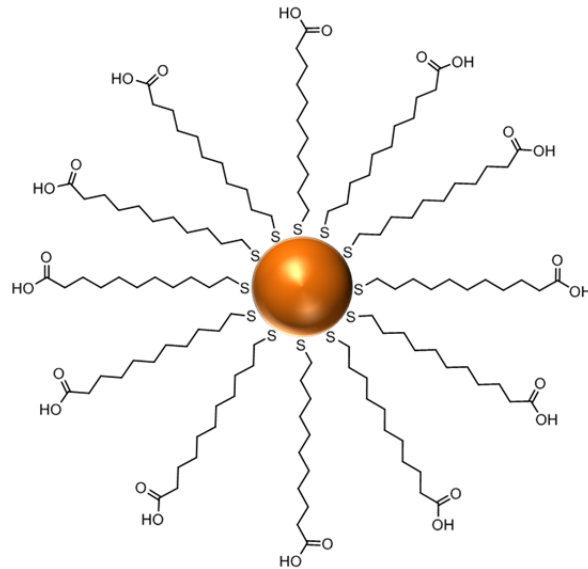
In Analogie zu bimetallicischen Ag-Au-Nanopartikeln, die mittels Citrat- oder Citrat/Tannin-Reduktion dargestellt werden konnten, sollte die Synthese auf ultrakleine Nanopartikel im Größenbereich von Metallclustern übertragen werden. Dazu wurde in Anlehnung an die Literatur<sup>[137,169]</sup> das im Vergleich zu Citrat und Tannin deutlich stärkere Reduktionsmittel Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) gewählt, um einen Großteil des vorgelegten Metallsalzes zu Keimen



umzusetzen, die durch die geringe Menge der in Lösung verbleibenden Metallionen nur in geringem Umfang weiterem Wachstum unterworfen sind. Zur raschen und effektiven Stabilisierung der ultrakleinen Nanopartikel wurden die in der Literatur mehrfach beschriebenen Mercapto-carbonsäureliganden 11-Mercaptoundecansäure und Liponsäure bzw. deren reduzierte Form Dihydroliponsäure ausgewählt. Durch die Thiolgruppe sollte eine stabile Bindung zwischen Metall und Ligand erzielt werden, während die endständige Carbonsäurefunktion eine im Vergleich zu sonst wesentlich prominenteren aliphatischen Thiolen eine ausreichend hohe Polarität bieten sollte, um eine stabile wässrige Dispersion der Nanopartikel zu ermöglichen. Da die funktionellen Gruppen des Liganden entscheidend für die Stabilität der resultierenden Nanopartikel sind, konnte kein stärkeres Reduktionsmittel als Natriumborhydrid verwendet werden, um Reduktionsreaktionen am Ligand zu vermeiden.

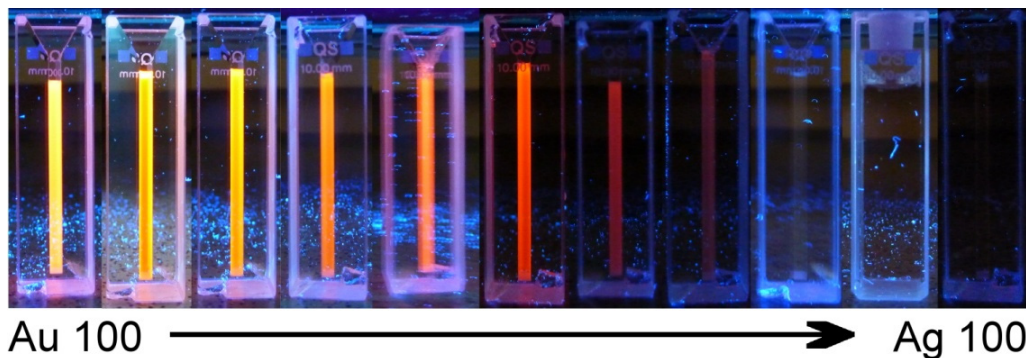
#### **4.5.1 Stabilisierung mit 11-Mercaptoundecansäure**

Ein weiterer Ansatz zur Darstellung von ultrakleinen bimetallischen Ag-Au-Nanopartikeln bestand in der Co-Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  in Gegenwart von 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA). Die grundlegende Synthese wurde ohne Zusatz eines Reduktionsmittels von *Sun et al.* zur Darstellung von ultrakleinen Goldnanopartikeln beschrieben.<sup>[170]</sup> In der hier dargestellten Synthese wurde zur möglichst simultanen Reduktion von Silber und Gold Natriumborhydrid hinzugefügt. Die schematische Darstellung eines durch 11-Mercaptoundecansäure stabilisierten Nanopartikels ist in Abbildung 78 gezeigt. Die Co-Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von 11-MUA führte nach Zugabe des Reduktionsmittels zu transparenten, sehr schwach grau-braun gefärbten Dispersionen.



**Abbildung 78: Skizzierung eines mit 11-Mercaptoundecansäure stabilisierten Nanopartikels.**

Unter UV-Licht zeigte ein Großteil der synthetisierten Nanopartikel eine starke gelb-orangene bis dunkelrote Fluoreszenz. In Abbildung 79 ist der Farbeindruck der Fluoreszenz von aufgereinigten 11-MUA-funktionalisierten bimetallic Nanopartikeldispersionen sowie der ebenfalls synthetisierten Ag-11-MUA- und Au-11-MUA-Nanopartikel gezeigt.



**Abbildung 79: Fluoreszenz von bimetallic Silber-Gold-11-MUA-Nanopartikeln mit Zusammensetzungen von Ag:Au-10:90 bis Ag:Au-90:10 und reinen Au-11-MUA und Ag-11-MUA-Nanopartikeln unter UV-Licht (366 nm).**

Die Stabilität der Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel war auf Grund des Protonierungsgleichgewichts der terminalen Carbonsäuregruppe der Thioliganden vom pH-Wert abhängig. Um eine Deprotonierung der Säuregruppe und dadurch eine erhöhte Polarität und verlängerte Stabilität der Nanopartikel zu gewährleisten, wurden die Dispersionen mit Borax/HCl-Puffer (finale Pufferkonzentration: 20 mmol L<sup>-1</sup> Tetraborat) auf einen pH-Wert

von 9 eingestellt. Der Boraxpuffer wurde gewählt, da Tetraborat ebenfalls im Zuge des Reduktionsprozesses mit Natriumborhydrid als Nebenprodukt generiert wird. So konnten zusätzliche chemische Komponenten im System vermieden werden. Durch die pH-Abhängigkeit der Partikelstabilität war eine Aufreinigung auch über vorsichtiges Ansäuern auf  $\text{pH} \approx 4$  mit HCl möglich. Die auf Grund der deutlich unpolareren protonierten Carboxygruppe agglomerierten Nanopartikel konnten nach Ansäuern schonend abzentrifugiert werden.

Um die Elementzusammensetzung der ultrakleinen Nanopartikel zu bestimmen, wurden die aufgereinigten Dispersionen mittels AAS untersucht. Die analytisch ermittelten Zusammensetzungen (siehe Tabelle 21) zeigten leichte Abweichungen von den theoretischen Werten, allerdings sind klare Unterscheidungen der unterschiedlichen Ag:Au-Partikelsysteme möglich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Nanopartikel im Folgenden ausschließlich mit ihrer theoretischen Zusammensetzung bezeichnet.

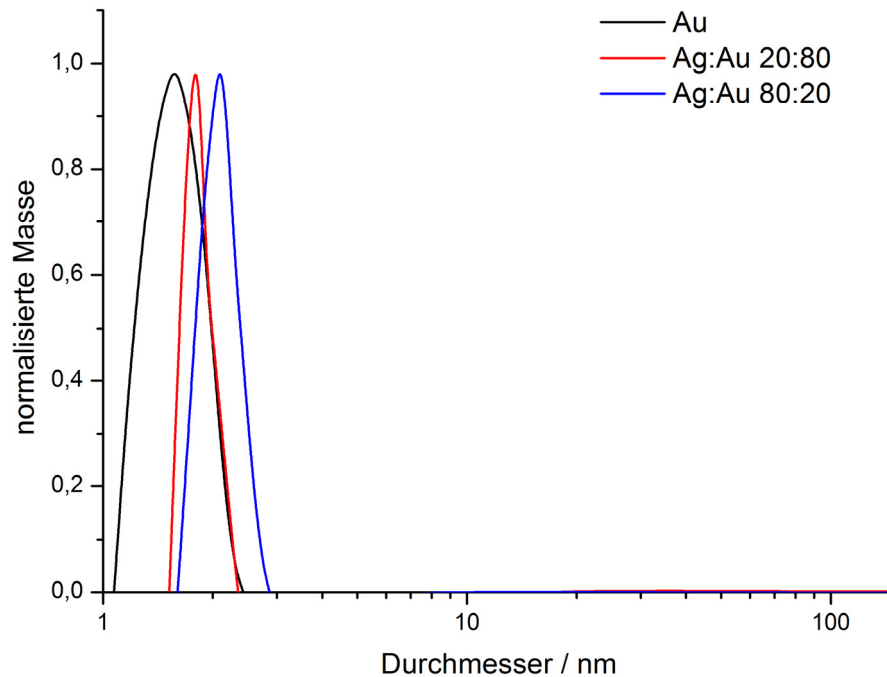
**Tabelle 21: Bestimmung der molaren Zusammensetzung der bimetallicen Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel mittels AAS.**

Theoretische molare Ag:Au-Zusammensetzung	Molare Ag:Au-Zusammensetzung laut AAS
10:90	7 : 93
20:80	21 : 79
30:70	32 : 68
40:60	37 : 63
50:50	50 : 50
60:40	60 : 40
70:30	72 : 28
80:20	80 : 20
90:10	88 : 12

Partikelgröße und Morphologie der synthetisierten ultrakleinen Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel wurden mittels DCS und TEM untersucht. Von DLS-Messungen wurde abgesehen, da die Lichtstreuung wahrscheinlich auf

Grund der sehr kleinen Partikelgröße keine realistischen Ergebnisse produzierte. Trotz fehlender DLS-Messungen ist anzunehmen, dass die Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel in gepuffertem Medium ein negatives Zetapotential aufwiesen. Der isoelektrische Punkt wäre wahrscheinlich im Bereich des  $pK_s$ -Wertes von 11-Mercaptoundecansäure zu erwarten, da für eine Monolage 11-MUA auf einer makroskopischen Goldoberfläche ein  $pK_s$ -Wert von 5,4 bestimmt wurde.<sup>[171]</sup> Dies würde sich mit den Beobachtungen zur vom pH-Wert abhängigen Stabilität und einer Agglomeration bei  $pH \approx 4$  decken.

Analysen der Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der DCS zeigten monomodale Verteilungen mit geringer Breite, was auf hinreichende Monodispersität schließen lässt. Die aus den massengewichteten Partikelgrößenverteilungen ermittelten durchschnittlichen Partikeldurchmesser der Ag-Au-Nanopartikel lagen zwischen 1,7 nm und 2,1 nm. Die reinen Au-Nanopartikel lagen mit einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 1,6 nm ähnlich wie die reinen Ag-Nanopartikel mit 2,2 nm in der gleichen Größenordnung. In Abbildung 80 sind drei repräsentative massengewichtete Partikelgrößenverteilungen von 11-MUA-stabilisierten bimetallic Ag:Au-20:80- (1,8 nm) und Ag:Au-20:80- (2,1 nm), sowie reinen Au-Nanopartikeln (1,6 nm) gezeigt, die die Monodispersität und die sehr ähnliche Partikelgröße der unterschiedlichen Partikelsysteme verdeutlichen. Da keine weiteren Signale im Größenbereich bis 150 nm detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass die endständige Carbonsäurefunktion eine ausreichende elektrostatische Stabilisierung gegenüber der Agglomeration lieferte.



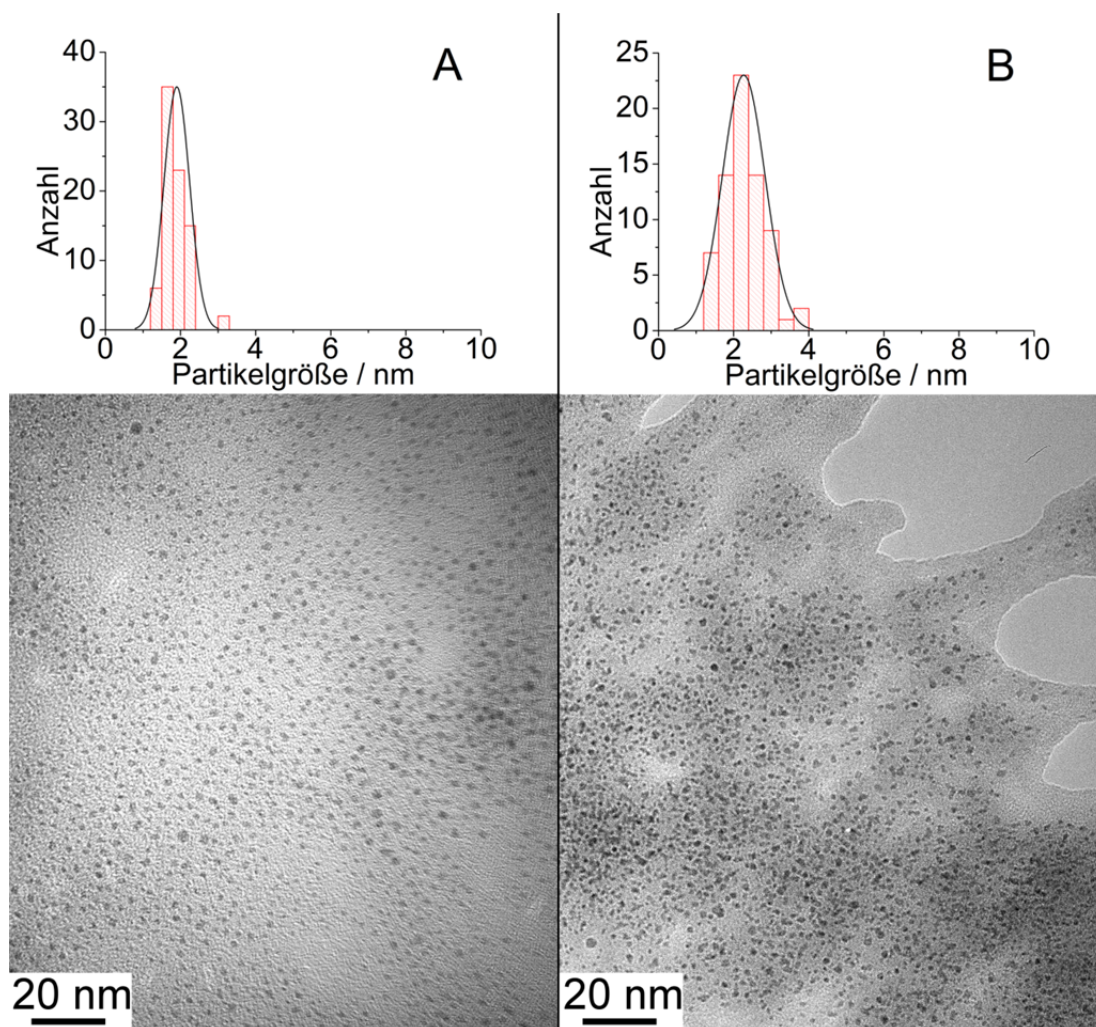
**Abbildung 80: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an 11-MUA-stabilisierten Au-, Ag:Au-20:80- und Ag:Au-80:20-Nanopartikeln.**

Eine Zusammenstellung der mit analytischer Scheibenzentrifugation ermittelten durchschnittlichen massegewichteten Partikeldurchmesser ist in Tabelle 22 gegeben. Aus den massegewichteten Größenverteilungen wurden zwecks Vergleichbarkeit mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen anzahlgewichtete Verteilungen errechnet, die ebenfalls in Tabelle 22 aufgeführt sind.

**Tabelle 22:** Aus DCS-Messungen ermittelte durchschnittliche masse-gewichtete Partikeldurchmesser 11-MUA-stabilisierter Ag-Au-Nanopartikel, sowie daraus errechnete anzahlgewichtete Partikeldurchmesser.

Ag:Au / mol%:mol%	<i>D</i> nach Masse (DCS) /	<i>D</i> nach Anzahl (DCS) /
	nm	nm
0:100	1,6	1,4
10:90	1,7	1,6
20:80	1,8	1,7
30:70	1,8	1,7
40:60	1,8	1,6
50:50	1,8	1,7
60:40	2,1	2
70:30	2,0	1,9
80:20	2,1	2
90:10	2,1	2
100:0	2,2	2,1

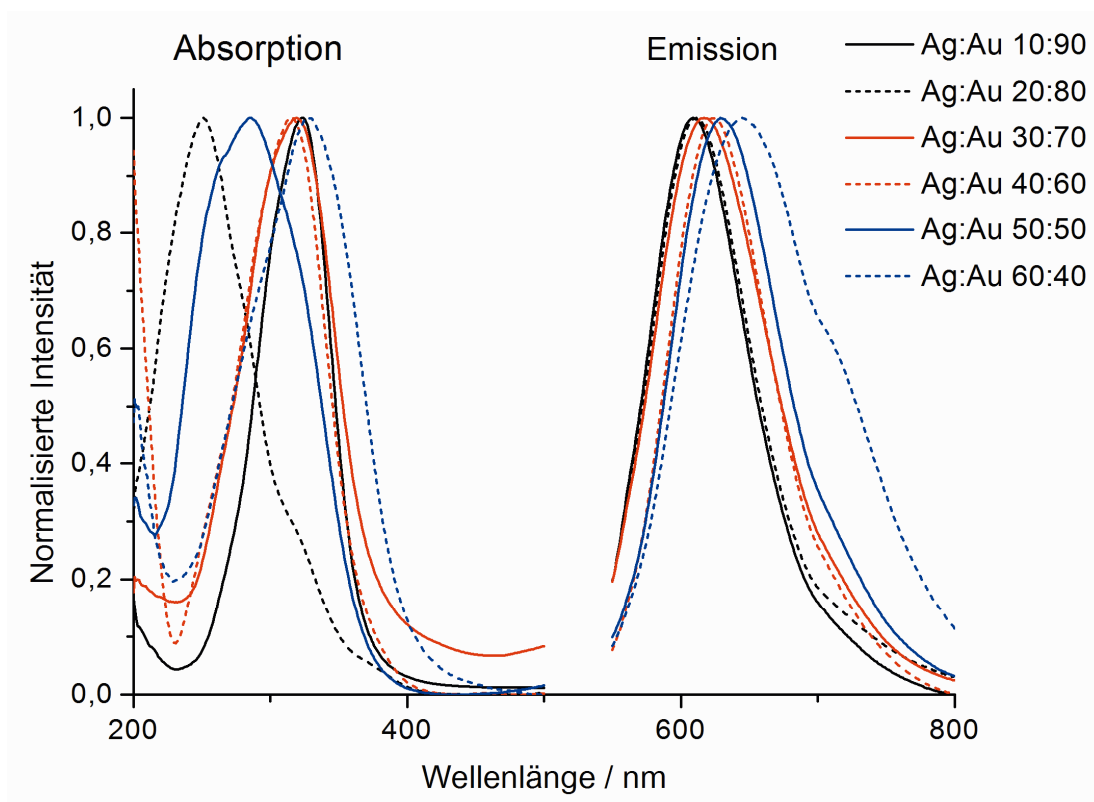
TEM-Aufnahmen der Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel belegten die Monodispersität der nanoskopischen Systeme. Auf den Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Partikel eine quasisphärische Morphologie aufwiesen. Es waren keine offensichtlichen Anzeichen von Agglomeration oder Aggregation erkennbar. Die in Abbildung 81 dargestellten TEM-Aufnahmen zeigen 11-MUA-funktionalisierte Ag:Au-30:70-Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 1,9 nm (A), sowie Ag:Au-80:20-Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,1 nm. Die Partikelgrößen wurden durch manuelles Auszählen und Vermessen von 100 Partikeln ermittelt. Die aus TEM-Aufnahmen gemessenen Partikelgrößen lagen um etwa 0,1 - 0,2 nm über den mittels DCS gemessenen anzahlgewichteten Partikeldurchmessern. Dies ist wahrscheinlich auf die durch den organischen Liganden verringerte effektive Dichte der Partikel zurückzuführen, die eine Unterschätzung der Partikelgröße in der Scheibenzentrifuge zur Folge hat.



**Abbildung 81: TEM-Aufnahmen von bimetallic Ag:Ag-Au-11-MUA-Nanopartikeln, A: Ag:Ag-Au-30:70,  $d = 1,9$  nm, B: Ag:Ag-Au-80:20,  $d = 2,1$  nm.**

Die aufgereinigten Dispersionen waren unter sichtbarem Licht nahezu farblos (hoher Goldanteil) bis hin zu schwach graubraun gefärbt (hoher Silberanteil). Unter UV-Licht (254 / 365 nm) zeigten die 11-MUA-stabilisierten reinen Au-Nanopartikel, sowie Ag-Au-Nanopartikel mit molaren Ag:Ag-Zusammensetzungen zwischen 10:90 und 60:40 eine deutlich sichtbare Autofluoreszenz. Partikel mit höherem Silbergehalt zeigten hingegen nur sehr schwache, dunkelrote (Ag:Ag-70:30) bzw. gar keine (Ag:Ag-80:20-, Ag:Ag-90:10 und reine Ag-Nanopartikel) Autofluoreszenz. Dies könnte auf den Partikeldurchmesser von ~2 nm zurückzuführen sein, da Fluoreszenz von ultrakleinen Ag-Nanopartikeln in der Literatur erst unterhalb einer Partikelgröße von 1,3 nm beschrieben wird.<sup>[84,91]</sup> Um die optischen Eigenschaften der fluoreszenten Nanopartikel zu analysieren, wurden die Dispersionen mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Analysen

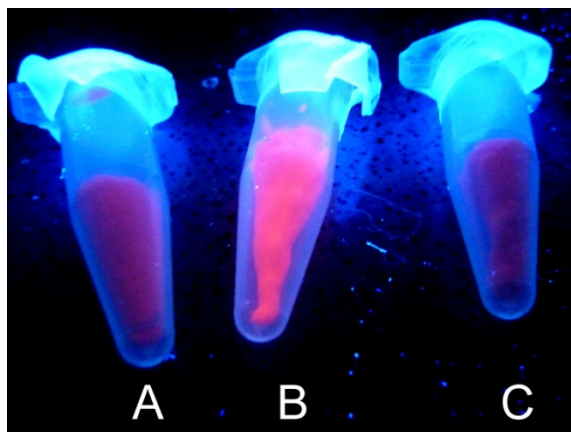
ergaben, dass die Absorptionsspektren der Partikel nahezu symmetrisch waren und ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen zwischen 260 nm und 350 nm zeigten. Es war jedoch kein Trend zwischen der Wellenlänge des Maximums und der Zusammensetzung der Partikel erkennbar. Die symmetrischen Emissionsspektren wiesen einen großen *Stokes-Shift* von bis zu 350 nm auf (Ag:Au-20:80). Diese Beobachtung ist literaturbekannt und deckt sich mit Analysen von Au-11-MUA und Mercaptobernsteinsäure-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln.<sup>[170,172]</sup> Die großen Shifts, die solchen in lumineszenten Au(I)-Komplexen ähneln, können auf elektronische  $d \rightarrow sp$ -Übergänge zurückgeführt werden.<sup>[153,173]</sup> Die Maxima der Emissionsspektren zeigten, einem Trend von 610 nm (Ag:Au-10:90) nach 645 nm (Ag:Au-60:40) folgend, einen Rot-Shift, der proportional zum Silbergehalt der Nanopartikel verlief. Ein kompositionsabhängiger Rot-Shift wurde für ein Gluthathion-stabilisiertes Ag:Au-Partikelsystem ebenfalls beobachtet.<sup>[136]</sup> Die Absorptionsspektren und Emissionsspektren der Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel sind in Abbildung 82 dargestellt.



**Abbildung 82: Absorptions- und Emissionsspektren von 11-MUA-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikeln in unterschiedlichen molaren Kompositionen.**

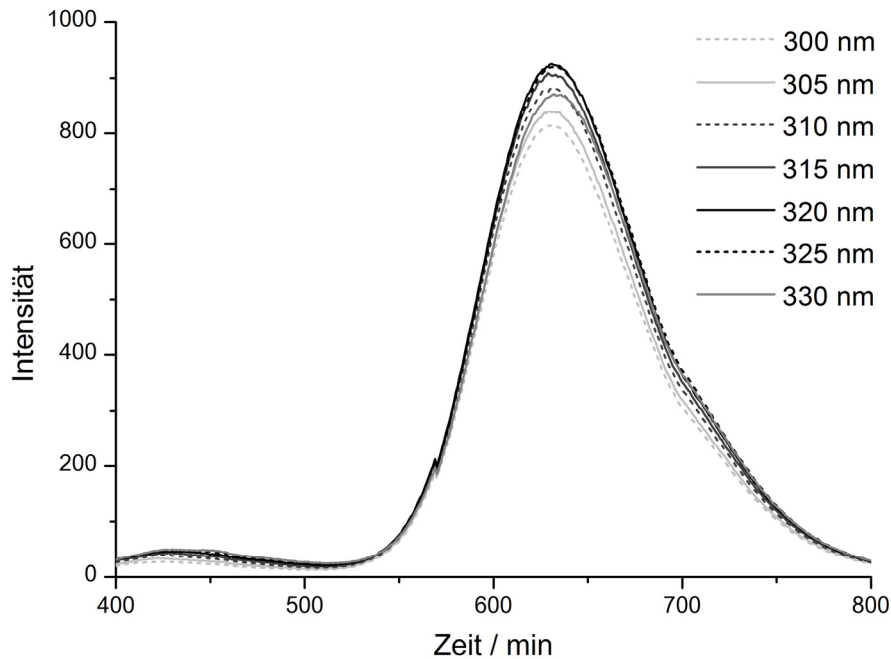


Die Farbe des emittierten Lichts der Ag-Au-Nanopartikel zeigte nach Ausfällen und anschließendem Gefriertrocknen (ohne Kryoprotektor) eine Rotverschiebung, blieb aber generell erhalten (Abbildung 83), was für eine hohe Stabilität des Edelmetallpartikel-Thiol-Systems spricht.



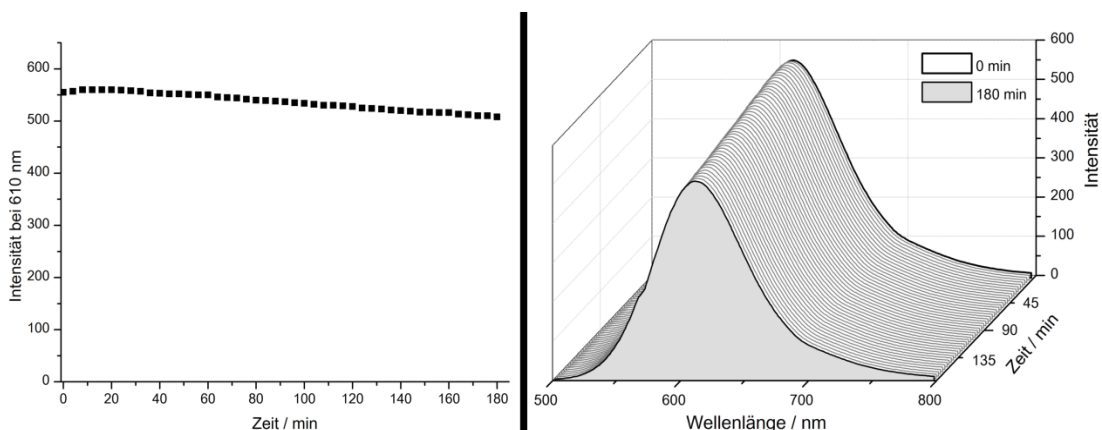
**Abbildung 83** Fluoreszenz von ausgefällten und lyophilisierten Ag:Au-11-MUA-Nanopartikeln unter 366 nm UV-Licht. A: Ag:Au-50:50, B: Ag:Au-10:90, Ag:Au-60:40.

Wie in Abbildung 84 gezeigt, veränderten sich die Emissionsspektren und ihre Maxima bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen nur in ihrer Intensität und wiesen keine signifikante Verschiebung auf. Diese Beobachtung spricht für eine fluorophortypische Dissipation der Anregungsenergie und beweist, dass die detektierten Signale tatsächlich von Fluoreszenz und nicht von Streulicht herrühren.<sup>[174]</sup> Die Photostabilität der fluoreszierenden Ag:Au-11-MUA wurde in einem Dauerbestrahlungsexperiment untersucht. Dazu wurde die Dispersion (Ag:Au-10:90) im Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 180 min kontinuierlich mit einer Xenon-Blitzlampe bei  $\lambda = 300$  nm bestrahlt. Alle 8 min wurde ein Emissionsspektrum aufgezeichnet.



**Abbildung 84: Emissionsspektren von Ag:Au-40:60-11-MUA-Nanopartikeln, aufgenommen bei verschiedenen Anregungswellenlängen.**

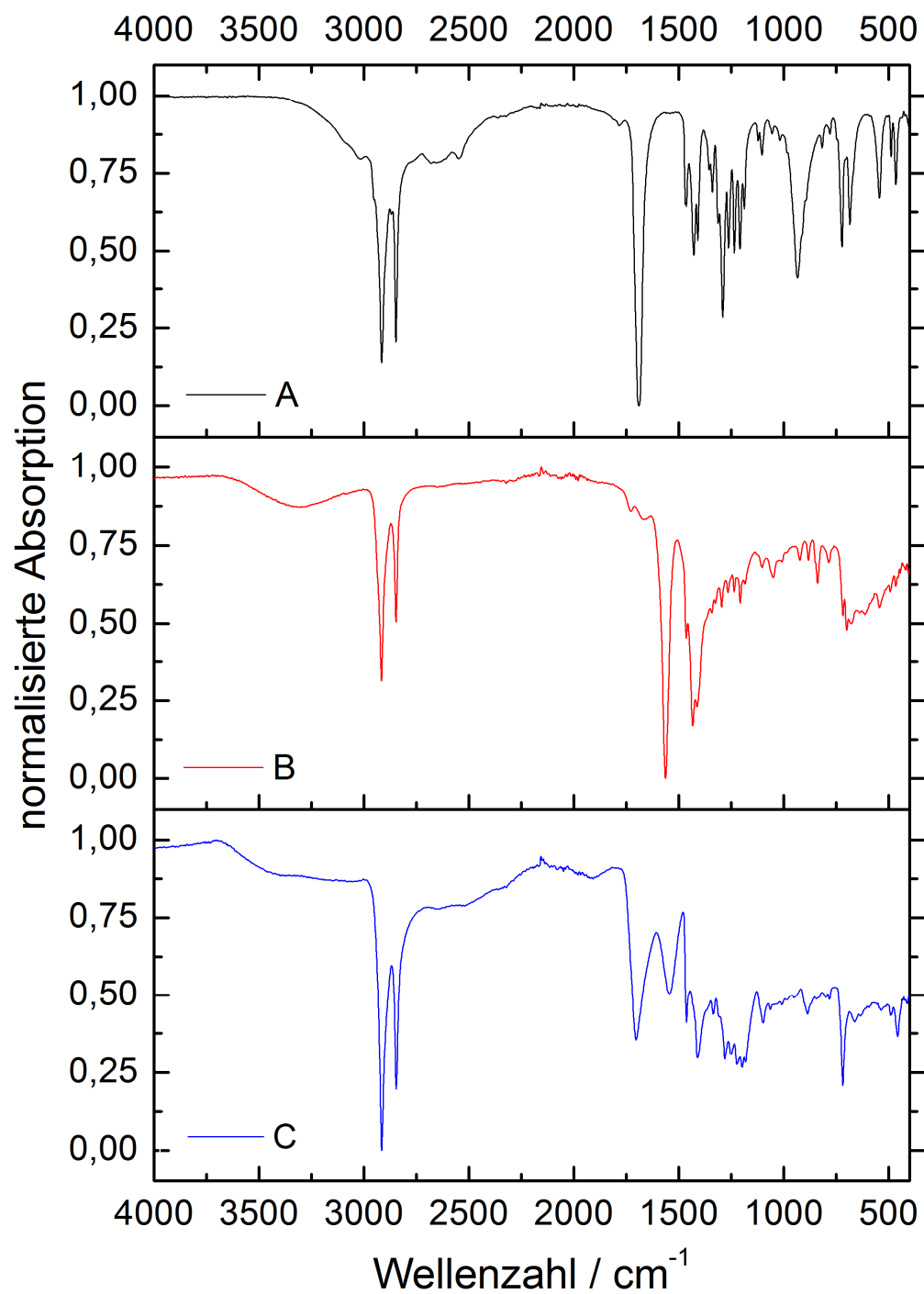
Wie in Abbildung 85 gezeigt, verringerte sich die Intensität des Emissionsmaximums bei 610 nm im Laufe der Zeit langsam. Während bei der ersten Messung eine Intensität von 555 gemessen wurde, ergab die letzte Messung nach 180 min eine Intensität von 507. Dieser Intensitätsabfall von 9 % war irreversibel, wie in einer Messung 24 h nach Beendigung des Experiments beobachtet wurde, zeigte jedoch die exzellente Stabilität der Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel gegenüber dem Ausbleichen.



**Abbildung 85: Emissionsintensität von Ag:Au-10:90-11-MUA-Nanopartikeln bei 610 nm (links) und Emissionsspektren von Ag:Au-10:90-11-MUA-Nanopartikeln bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm (rechts), aufgenommen alle 8 min während 180 min Bestrahlung.**

Zur Charakterisierung der Ligandenhülle und von Parametern wie Ligandenorientierung eignen sich unter anderem IR- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie.<sup>[58,68,175,176]</sup> Da die Orientierung von Liganden besonders im Falle von bifunktionalen Liganden wie der hier verwendeten 11-MUA von hoher Wichtigkeit ist, um eine Verfügbarkeit von funktionellen Gruppen für eine spätere chemische Modifizierung der Oberfläche zu kontrollieren, wurden lyophilisierte Ag: Au-11-MUA-Nanopartikel mittels ATR-Spektroskopie untersucht. Das Verschwinden von charakteristischen Schwingungen bestimmter funktioneller Gruppen, wie in diesem Fall zum Beispiel die -SH oder -COOH-Banden, wird in der Literatur als Hinweis auf eine Bindung zwischen der funktionellen Gruppe und der Partikeloberfläche angesehen.<sup>[46,58,61]</sup>

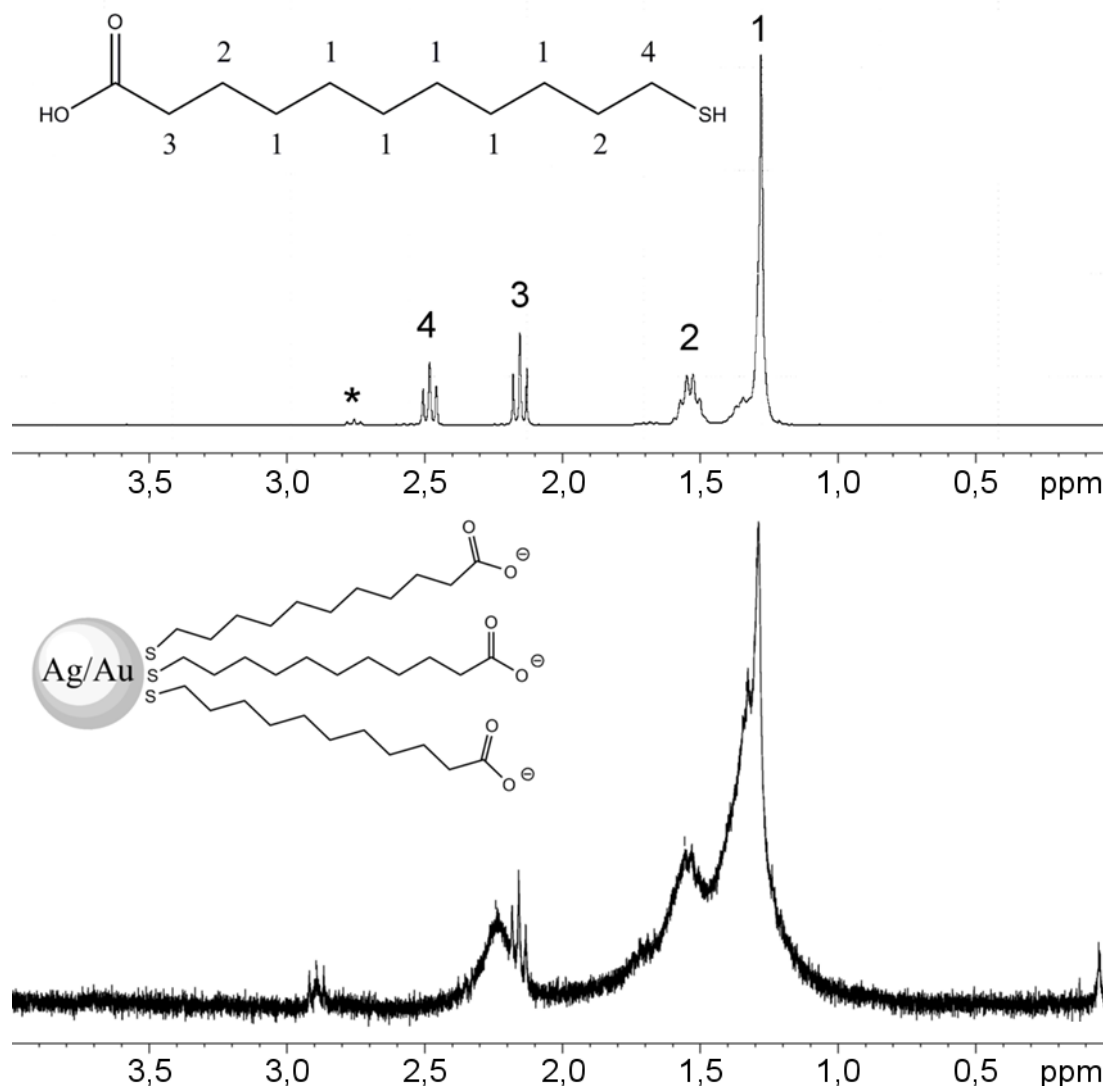
In Abbildung 86 sind drei repräsentative ATR-Spektren dargestellt. Der freie Ligand (A) zeigte charakteristische Banden bei  $2915 / 2848 \text{ cm}^{-1}$  (symmetrische und asymmetrische  $-\text{CH}_2-$  Streckschwingung),  $2550 \text{ cm}^{-1}$  (S-H Streckschwingung),  $1690 \text{ cm}^{-1}$  (C=O Streckschwingung),  $1290\text{-}1188 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$  Progressionsbanden) und  $933 \text{ cm}^{-1}$  (*out-of-plane* O-H Deformationsschwingung), einem Anzeichen für H-Brückenbildung zwischen vorliegenden Carbonsäuredimeren. Aufgereinigte, gepufferte (pH 9) und lyophilisierte Ag: Au-50:50-11-MUA-Nanopartikel (B) zeigten scharfe  $-\text{CH}_2-$  Banden bei  $2916 / 2847 \text{ cm}^{-1}$  und schwach ausgebildete Progressionsbanden bei  $1297\text{-}1209 \text{ cm}^{-1}$ . Die Progressionsbanden geben einen Hinweis auf eine geordnete *all-trans* Anordnung der aliphatischen C-11-Kette der 11-MUA.<sup>[61,177]</sup> Dies lässt die Vermutung zu, dass die mikroskopische Umgebung der aliphatischen Kette des Thiolliganden der Kristallinität von Kohlenwasserstoffen in Bulkmaterial und Alkanthiolat-Monolayern auf planaren Goldoberflächen ähnelt.<sup>[61,178]</sup> Das Fehlen der S-H Bande ( $\sim 2550 \text{ cm}^{-1}$ ) weist darauf hin, dass die 11-Mercaptoundecansäure über die Thiolfunktionalität an die Metalloberfläche der Partikel gebunden ist. Eine Verschiebung der C=O Bande nach  $1564 \text{ cm}^{-1}$  deutet auf deprotonierte Carboxylatgruppen hin. Diese Beobachtung deckt sich mit der Probenpräparation und Pufferung auf pH = 9.



**Abbildung 86: ATR-Spektren A: Freie 11-MUA, B: Lyophilisierte Ag:Au-50:50-11-MUA-Nanopartikel aus gepufferter Dispersion, C: Lyophilisierte Ag:Au-50:50-11-MUA-Nanopartikel aus saurer Fällung.**

Das dritte ATR-Spektrum stammt von sauer gefällten ( $\text{pH} \approx 4$ ) Ag: Au-50:50-Nanopartikeln. Die Partikel wurden mit HCl angesäuert, abgetrennt und lyophilisiert. Das Spektrum zeigt charakteristische  $-\text{CH}_2-$  Banden bei  $2916 / 2847 \text{ cm}^{-1}$  und schwach ausgeprägte Progressionsbanden bei  $1294 - 1195 \text{ cm}^{-1}$ . Die S-H Bande fehlt, was auf die Ausbildung einer RS-Metallbindung hindeutet. Die  $-\text{C}=\text{O}$  Streckschwingung bei  $1699 \text{ cm}^{-1}$  spricht für eine protonierte Carbonsäurefunktion. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Probenpräparation.

Um weitere Informationen über die Ligandenorientierung zu gewinnen und die Befunde der IR-Messungen zu belegen, wurden einige Ag: Au-11-MUA-Dispersionen mit  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie analysiert. Die Interaktion zwischen Ligand und Metalloberfläche führt zu Veränderungen im resultierenden Spektrum. Im Vergleich zu freien Liganden zeigen adsorbierte Moleküle eine deutliche Peakverbreiterung und eine andere chemische Verschiebung. Die Verbreiterung der Peaks ist Resultat einer schnellen Spinrelaxation durch dipolare Wechselwirkungen mit dem metallischen Partikelkern und wird mit geringer werdendem Abstand der Methylengruppen zur Nanopartikeloberfläche verstärkt.<sup>[46,175]</sup> Des Weiteren können eine Veränderung der magnetischen Suszeptibilität an der Ligand-Metall-Grenzfläche und Peakverbreiterung durch Spin-Spin-Relaxation, welche von der Diffusionsgeschwindigkeit der Nanopartikel in Dispersion abhängt, zu einer deutlichen Differenz zwischen freiem Ligand und adsorbierter Spezies führen.<sup>[46]</sup> Dies kann in einem vollständigen Verschwinden der nahe am Metallkern liegenden Methylengruppen resultieren. Auf Grund dieser Unterschiede in Ligand- und Nanopartikel-Ligand-Spektren können terminale und in Richtung des Nanopartikels zeigende Molekülgruppen identifiziert werden, was eine Vorhersage der Ligandenorientierung möglich macht.<sup>[46,68,175,179]</sup>



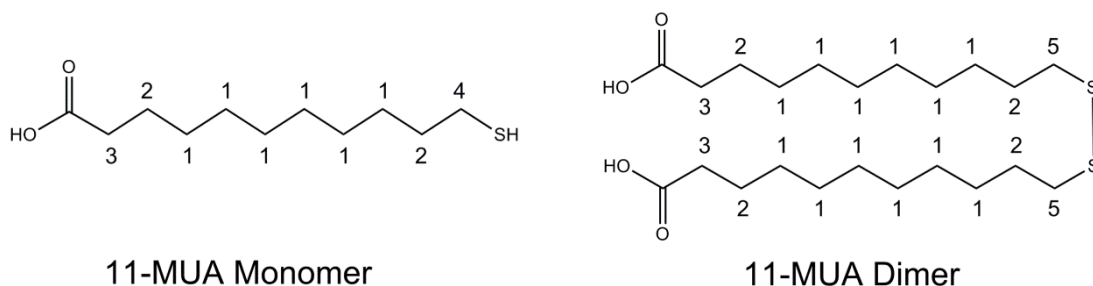
**Abbildung 87:** <sup>1</sup>H-NMR von 11-MUA (oben) und aufgereinigten Ag:Au-70:30-11-MUA-Nanopartikeln (unten), gemessen in D<sub>2</sub>O mit NaOD.

In Abbildung 87 sind die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von reiner 11-MUA (300 MHz, D<sub>2</sub>O, NaOD,  $\delta$ ): 1,28 (m, 12H, CH<sub>2</sub>), 1,53 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,16 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>), 2,49 ppm (t, 2H, CH<sub>2</sub>-S<sup>-</sup>) und aufgereinigten Ag:Au-70:30-11-MUA-Nanopartikeln gezeigt (300 MHz, D<sub>2</sub>O, NaOD,  $\delta$ ): 1,0 - 1,48 (br m, 12H, CH<sub>2</sub>), 1,48 - 1,85 (br m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,10 - 2,42 (br m, t. 2H, CH<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>). Ein Vergleich der Spektren zeigt, dass alle Signale des Ag:Au-70:30-Spektrums stark verbreitert sind und kein freier Ligand mehr in der Dispersion vorhanden zu sein scheint. Die  $\alpha$ -Methylengruppe in direkter Nachbarschaft zur Thiolgruppe (4) wurde nicht mehr detektiert, was dafür spricht, dass der Ligand über die Thiolfunktionalität an die Metalloberfläche gebunden vorliegt und die terminale Carbonsäurefunktion somit für potentielle chemische

Modifikationen über Kopplungsreaktionen oder Manipulationen der Stabilität durch Veränderungen des pH-Werts verfügbar bleibt.

Sowohl im Spektrum der freien 11-MUA, als auch im Spektrum der Ag: Au-70:30-11-MUA-Nanopartikel ist ein kleines Triplett (\*) bei 2,76 ppm bzw. 2,90 ppm zu erkennen. Dieses Triplet stammt von der  $\alpha$ -Methylengruppe der Disulfidform des Liganden, wie im Folgenden näher erläutert wird. Das im Partikelspektrum unter einem breiten Peak erkennbare Triplet bei 2,16 ppm stammt wahrscheinlich von der Methylengruppe direkt neben der Carbonsäurefunktion (3) des Disulfids.

Da Thiole in Gegenwart von Sauerstoff häufig zur Bildung der jeweiligen oxidierten disulfidischen Form neigen,<sup>[180]</sup> wurde das 11-MUA-Disulfid 11,11'-Disulfandiyldiundecanoat (Abbildung 88) entsprechend einer leicht modifizierten Literaturvorschrift<sup>[68]</sup> synthetisiert um die Zuordnung der Peaks der freien 11-Mercaptoundecansäure zu erleichtern.



**Abbildung 88: Strukturformel des 11-Mercaptoundecansäuremonomers und -dimers mit Protonenzuordnungen für die NMR-Spektren.**

Ein Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der freien 11-MUA und des Disulfids zeigt, dass die disulfidische Form ein Triplett bei 2,69 ppm aufweist, das der  $\alpha$ -Methylengruppe neben der Disulfidbrücke (5) zugeordnet werden kann. Das Quartett der  $\alpha$ -Methylengruppe der 11-MUA (4) ist nahezu verschwunden. Auf Grund dieser Analyseergebnisse kann das Triplet bei 2,68 ppm im 11-MUA-Spektrum (\*5) dem Disulfid zugeordnet werden.

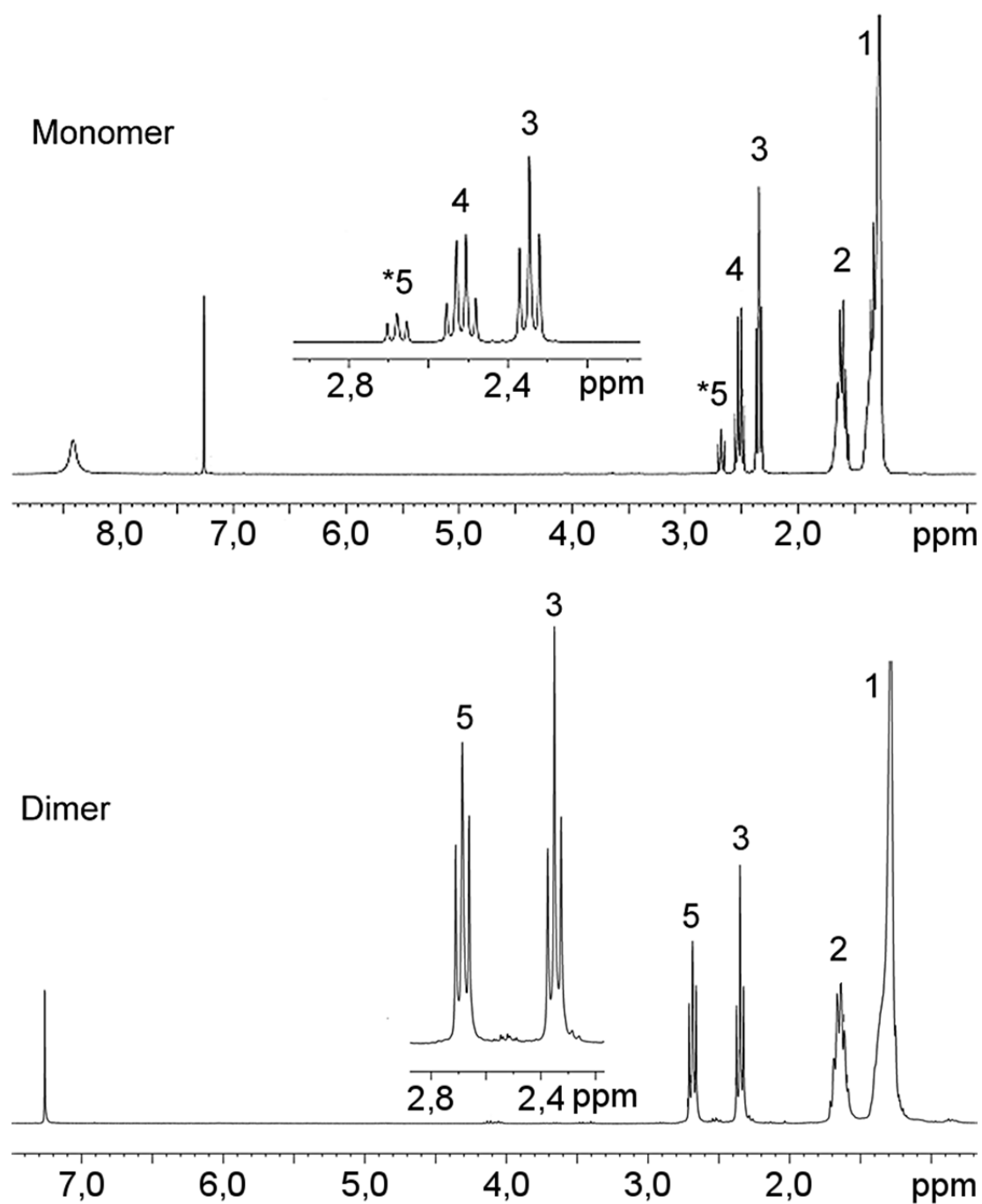
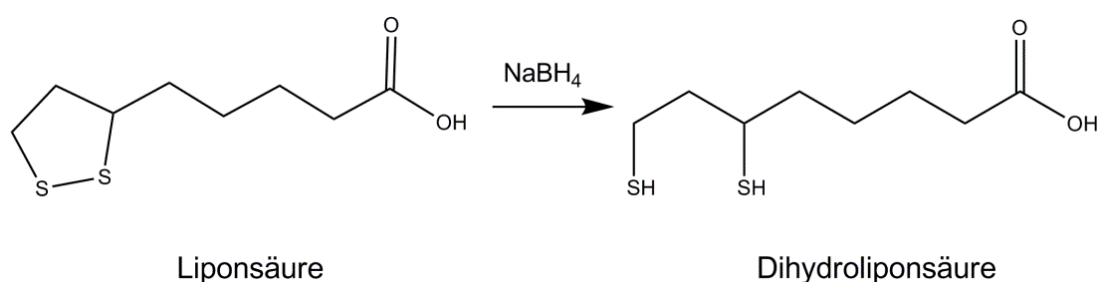


Abbildung 89: Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der freien 11-MUA (oben) und des Disulfids 11,11'-Disulfandiyldiundecanoat (unten) gemessen in  $\text{CDCl}_3$ .



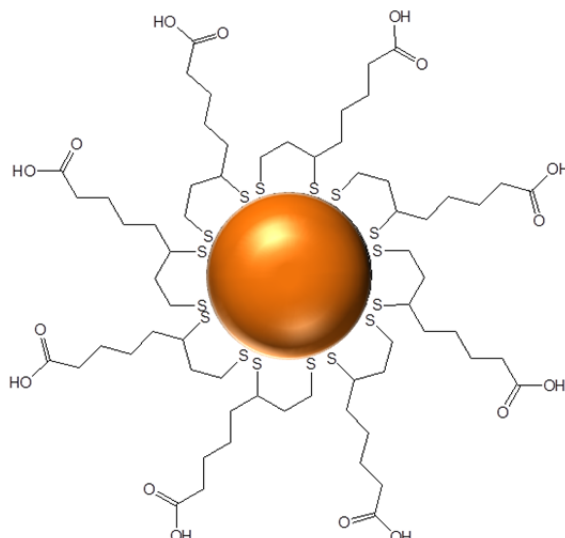
### 4.5.2 Stabilisierung mit Dihydroliponsäure

Ein weiterer Ansatz zur Darstellung von ultrakleinen bimetallischen Ag-Au-Nanopartikeln bestand in der Co-Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  in Gegenwart von Liponsäure. Die Synthese wurde von *Shang et al* zur Darstellung von ultrakleinen Goldnanopartikeln beschrieben.<sup>[53]</sup> Die verwendete Liponsäure, ein biogenes Disulfid, wird bei der Reduktion der Metallsalze durch  $\text{NaBH}_4$  *in situ* zum Dithiol, der Dihydroliponsäure (DHHLA) reduziert (Abbildung 90).



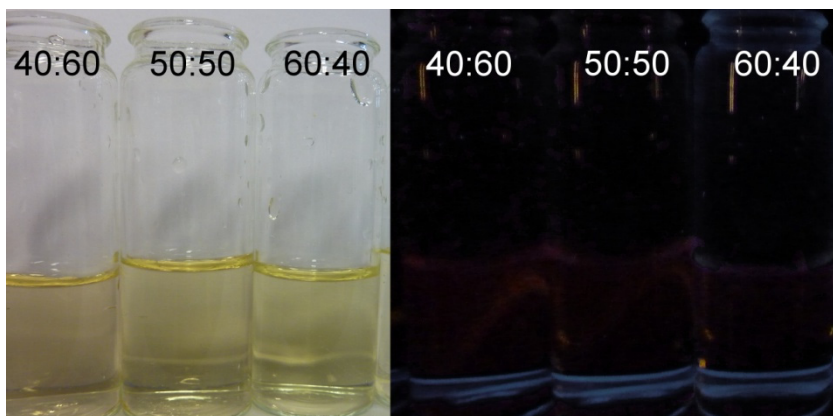
**Abbildung 90: Schematische Darstellung der Reduktion von Liponsäure (LA) zu Dihydroliponsäure (DHHLA).**

Durch die Verfügbarkeit von zwei Thiolgruppen pro Ligandenmolekül wird eine sehr hohe Bindungsstabilität erreicht und ein effektives Abfangen der ultrakleinen Nanopartikel ermöglicht. Auf Grund der endständigen Carbonsäuregruppe, für die ein  $\text{pK}_a$  von 4,85 berechnet wurde,<sup>[181]</sup> sollte durch gezieltes Einstellen des pH-Wertes der Dispersion und die folgende Deprotonierung der Carbonsäure eine ausreichende Stabilität in polaren Lösungsmitteln gewährleistet sein. Die schematische Darstellung eines durch Dihydroliponsäure stabilisierten Nanopartikels ist in Abbildung 91 gezeigt.



**Abbildung 91: Skizzierung eines mit Dihydroliponsäure stabilisierten Nanopartikels.**

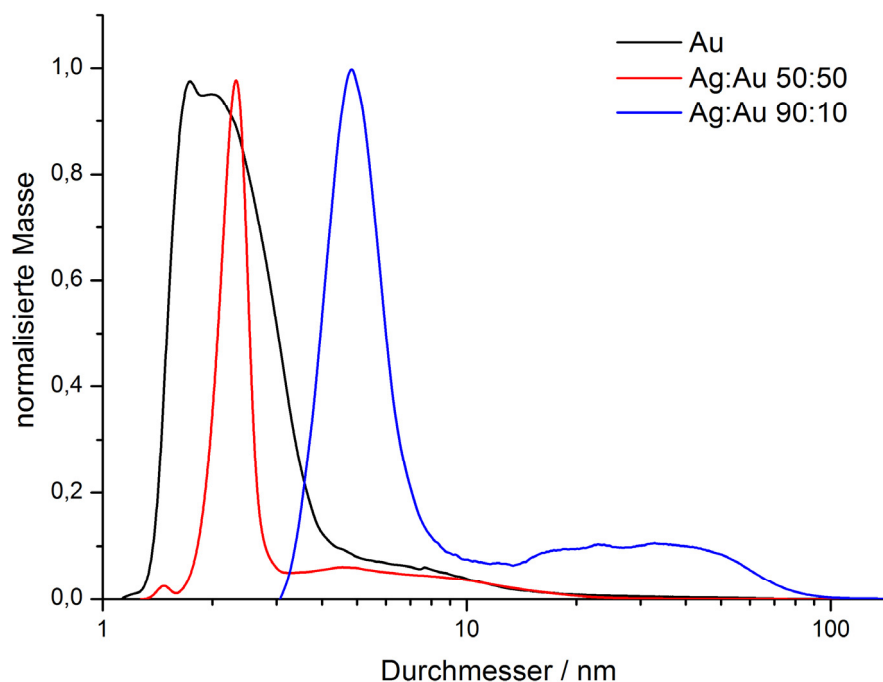
Die Co-Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  mit  $\text{NaBH}_4$  in Gegenwart von Liponsäure führte nach Zugabe des Reduktionsmittels zu transparenten, braun gefärbten Dispersionen. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden. Auch die reinen Au-DHLA-Nanopartikel zeigten im Gegensatz zu der Literatursynthese von *Shang et al.*<sup>[53]</sup> keine Emission. Erst nach etwa 72 h Standzeit war bei einigen Nanopartikelsystemen, wie in Abbildung 92 dargestellt, unter 366 nm UV-Licht eine sehr schwache dunkelrote Fluoreszenz auszumachen.



**Abbildung 92: DHLA-funktionalisierte Ag:Ag-Au-40:60-, Ag:Ag-Au-50:50- und Ag:Ag-Au-60:40-Nanopartikel in weißem (links) und 366 nm UV-Licht (rechts).**

Die Partikeldispersionen konnten über Spinfiltration (Amicon Spinfilter, 4000 Da; 4000  $\text{U min}^{-1}$ , 60 min) von überschüssigen Reaktionsprodukten abgetrennt werden. Die Partikelgröße und Morphologie der synthetisierten

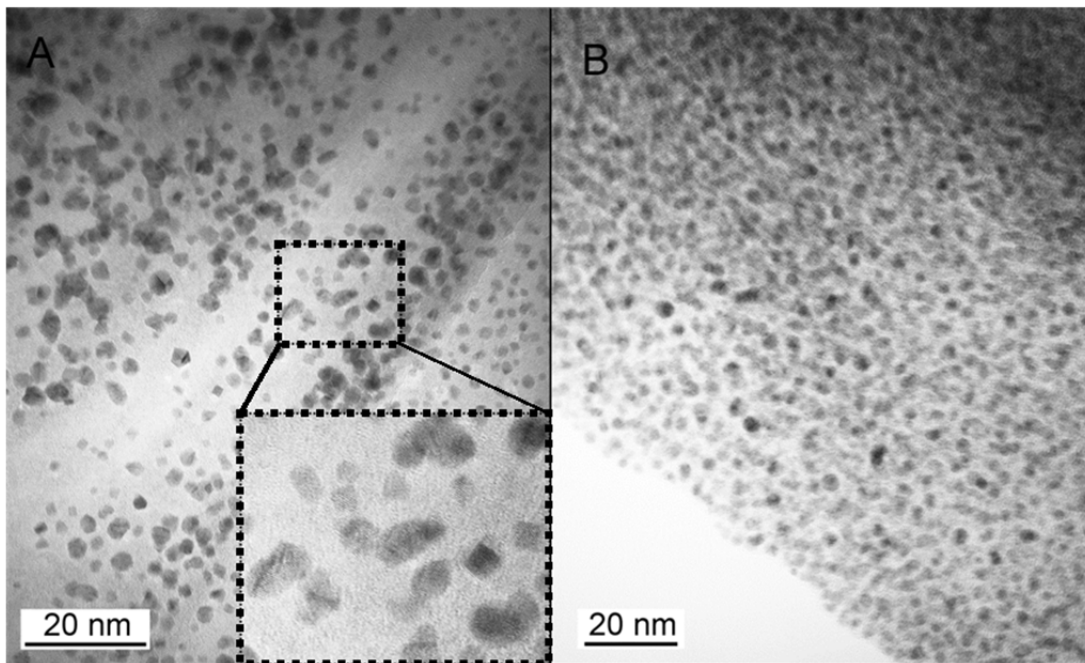
ultrakleinen Ag:Au-DHLA-Nanopartikel wurden mittels DCS und TEM untersucht. In Abbildung 93 sind drei Partikelgrößenverteilungen aus der analytischen Scheibenzentrifugation gezeigt. Die DCS-Messungen zeigten, dass die Verteilungskurven teilweise deutliche Schultern hatten und die Partikelsysteme zu Polydispersität neigten. So reichte die Partikelgröße der reinen Au-Nanopartikel, deren durchschnittlicher modaler Durchmesser 1,9 nm betrug, von etwa 1,5 nm bis 40 nm. In Dispersionen von Ag:Au-50:50-DHLA-Nanopartikel mit einem modalen Durchmesser von 2,4 nm wurden größere Partikel oder Agglomerate mit Durchmessern zwischen 5 und 20 nm detektiert. Eine deutliche Größenzunahme war für Ag:Au-90:10-Nanopartikel zu beobachten. Hier wurde ein durchschnittlicher modaler Durchmesser von 4,8 nm ermittelt. Neben der Hauptfraktion wurde ein größerer Anteil an Partikeln oder Agglomeraten zwischen 10 nm und 100 nm gefunden.



**Abbildung 93: Normalisierte massegewichtete Partikelgrößenverteilungen aus DCS-Messungen an DHLA-stabilisierten Au-, Ag:Au-50:50- und Ag:Au-90:10-Nanopartikeln.**

TEM-Aufnahmen der Ag:Au-DHLA-Nanopartikel zeigten eine eher geringe Polydispersität der nanoskopischen Systeme, was darauf hindeutet, dass die größeren Partikeldurchmesser aus DCS-Messungen auf Agglomerate und nicht auf sehr große Partikel zurückzuführen sind. Auf den TEM-Aufnahmen

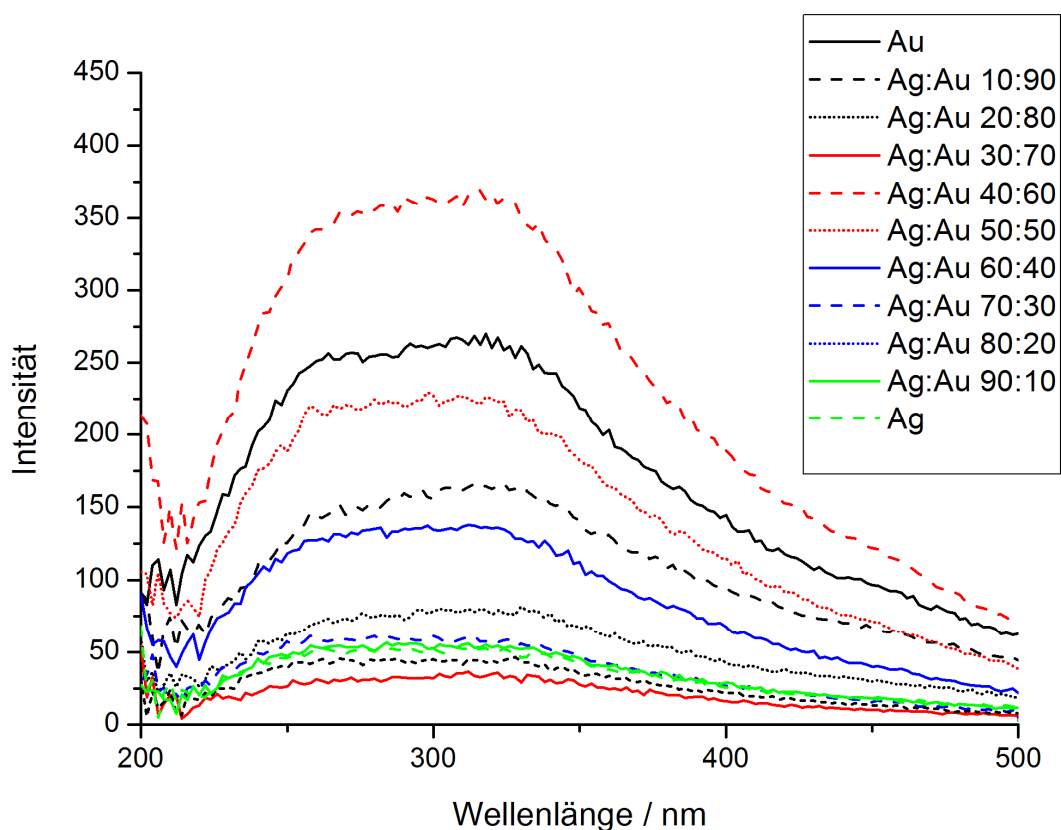
der Nanopartikel waren teilweise polymorphe Partikelstrukturen zu erkennen. Neben quasisphärischen Teilchen waren unter anderem auch kubische und formlose Partikel zu erkennen. Wie im vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 94 (A) gezeigt ist, schienen die Partikel trotz unterschiedlicher Morphologie zum größten Teil kristallin zu sein, wie die erkennbaren Netzebenen belegen. Manuelles Auszählen und Vermessen von mindestens 50 Partikeln ergab durchschnittliche Durchmesser von 2,8 nm für Ag:Au-10:90- und 3,1 nm für Ag:Au-30:70-Nanopartikel. Damit lagen die aus TEM-Aufnahmen gemessenen Partikelgrößen im Bereich der mittels DCS gemessenen Partikeldurchmesser.



**Abbildung 94:** TEM-Aufnahmen von bimetallic Ag:Au-DHLA-Nanopartikeln, A: Ag:Au-30:70,  $d = 3,1$  nm, B: Ag:Au-10:90,  $d = 2,8$  nm.

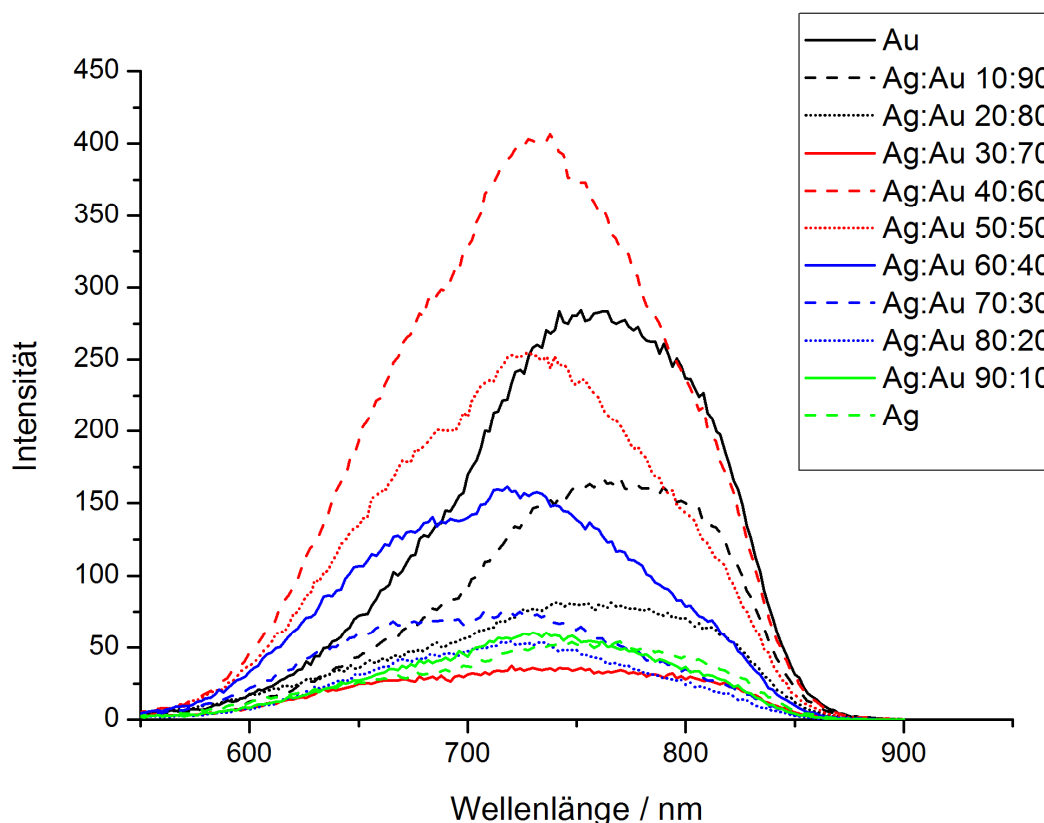
Um die optischen Eigenschaften der schwach fluoreszierenden Nanopartikel zu analysieren, wurden die Dispersionen mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass auch für die Partikelsysteme, deren Fluoreszenz optisch nicht bestätigt werden konnte, sehr intensitätsschwache Absorptions- und Emissionsspektren aufgenommen werden konnten. Die Absorptionsspektren der Partikel zeigen unabhängig von der Zusammensetzung einen nahezu identischen Verlauf mit einem breiten Absorptionsmaximum zwischen 260 nm und 360 nm. Dabei unterschieden sich die Absorptionsspektren deutlich in ihrer Intensität, die für

Ag:Au-40:60-Nanopartikel am größten war. Die Absorptionsspektren aller Ag:Au-DHLA-Nanopartikel sind in Abbildung 95 dargestellt.



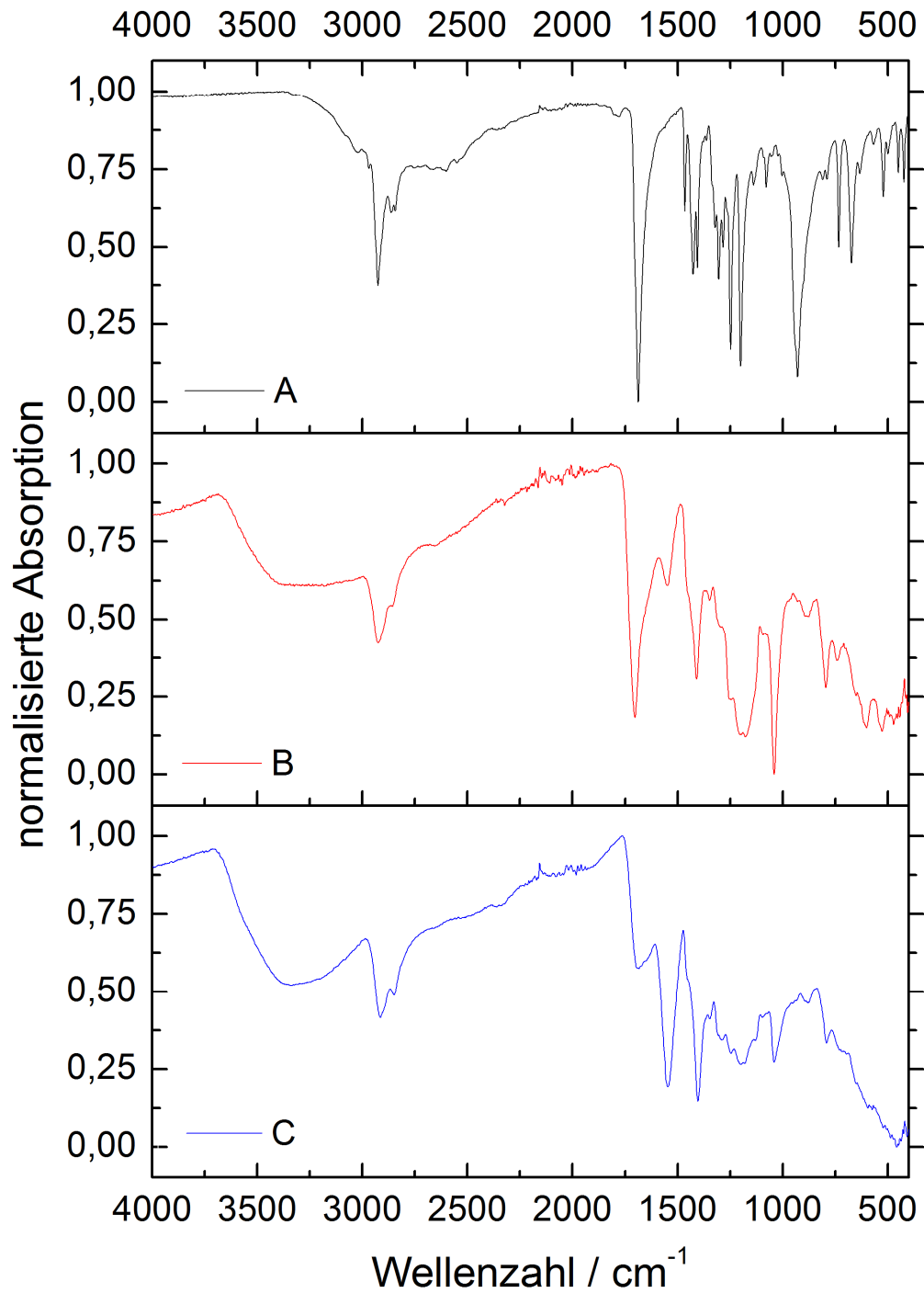
**Abbildung 95: Mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmte Absorptionsspektren von Ag:Au-DHLA-Nanopartikeln unterschiedlicher Komposition.**

Die breiten und relativ asymmetrischen Emissionsspektren der Ag:Au-DHLA-Nanopartikel wiesen einen sehr großen *Stokes-Shift* von bis zu 450 nm auf. Mit variierender Zusammensetzung der Nanopartikel änderten sich sowohl die maximale Wellenlänge der Emission als auch die Intensität. Dabei war kein linearer Zusammenhang zu beobachten (Abbildung 96). In Übereinstimmung mit den gemessenen Absorptionsspektren wiesen Ag:Au-40:60-Nanopartikel die höchste Emissionsintensität auf.



**Abbildung 96:** Mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmte Emissionsspektren von Ag:Au-DHLA-Nanopartikeln unterschiedlicher Komposition.

Zur Untersuchung der Ligandenhülle und der Orientierung der Dehydroliponsäure an der Partikeloberfläche wurden durch Spinfiltration aufgereinigte und gefriergetrocknete DHLA-stabilisierte Nanopartikel mittels ATR-Spektroskopie analysiert. In Abbildung 97 sind drei repräsentative ATR-Spektren dargestellt. Der freie Ligand (A) zeigte charakteristische Banden bei  $2926 / 2866 \text{ cm}^{-1}$  (symmetrische und asymmetrische  $-\text{CH}_2-$  Streck-schwingung),  $1687 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  Streckschwingung),  $1465 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$  Deformationsschwingung),  $1427 \text{ cm}^{-1} - 1200 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$  Dreh- und Wipp-schwingungen), sowie  $929 \text{ cm}^{-1}$  (*out-of-plane* O-H Deformations-schwingung), einem Anzeichen für H-Brückenbildung zwischen vorliegenden Carbonsäuredimeren.



**Abbildung 97:** ATR-Spektren von A: Freier Liponsäure, B: Lyophilisierten Ag:Au-50:50-DHLA-Nanopartikeln aus Spinfiltration, C: Lyophilisierten Au-DHLA-Nanopartikeln aus Spinfiltration.

Aufgereinigte und lyophilisierte Ag:Au-50:50-DHLA-Nanopartikel (B) zeigten eine breite OH-Bande zwischen  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  und  $2500\text{ cm}^{-1}$ , darüber liegende  $-\text{CH}_2-$  Banden bei  $2917 / 2845\text{ cm}^{-1}$ , zwei breite Banden bei  $1702\text{ cm}^{-1}$  und  $1547\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$  Streckschwingungen) und verbreiterte Banden der  $-\text{CH}_2$  Dreh- und Wippschwingungen zwischen  $1403 - 1209\text{ cm}^{-1}$ . Das Fehlen einer S-H Bande deutet darauf hin, dass die Dehydroliponsäure mit den Thiolgruppen an der Partikeloberfläche gebunden ist. Der Unterschied zwischen der energetischen Lage der  $\text{C}=\text{O}$  Schwingungen in Liponsäure und Dehydroliponsäure wird in der Literatur mit Veränderungen der elektronischen Umgebung der Carboxylgruppe beim Übergang der Liponsäure in die reduzierte Form beschrieben.<sup>[181]</sup> Das dritte ATR-Spektrum zeigt aufgereinigte und lyophilisierte Au-DHLA-Nanopartikel (C). Das Spektrum weist mit den Ag:Au-50:50-Nanopartikeln vergleichbare Banden auf, was darauf hindeutet, dass die Funktionalisierung der Partikel mit Dehydroliponsäure unabhängig von der Zusammensetzung über die Ausbildung einer Thiol-Metallbindung abläuft.

Auf Grund der in DCS-Messungen festgestellten zusammensetzungsabhängigen Größenunterschiede, der Polymorphie und der nur sehr schwachen Fluoreszenzintensität nach 72 h wurde von einer weiterführenden Charakterisierung und Verwendung der Partikel abgesehen.

#### **4.5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Synthesen von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln**

Eine Darstellung von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln wurde über zwei Synthesewege angestrebt. Zum einen wurden  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  in Gegenwart von 11-Mercaptoundecansäure, zum anderen in Gegenwart von Liponsäure mit Natriumborhydrid reduziert. Die Darstellung der 11-MUA-Ag-Au-Nanopartikel, die in Anlehnung an eine Publikation von Sun et al.<sup>[170]</sup> synthetisiert wurden, führte zu nahezu farblosen Dispersionen, die in Zusammensetzungen zwischen Ag:Au-10:90 und Ag:Au-60:40 unter UV-Licht deutliche Fluoreszenz zeigten. Die Nanopartikel konnten aufgereinigt werden und hatten laut AAS-Messungen Zusammensetzungen, die nahe an den theoretischen Ag:Au-Verhältnissen lagen. Partikelgrößenmessungen mittels DCS und TEM ergaben durchschnittliche Durchmesser zwischen



1,6 nm und 2 nm, unabhängig von der Zusammensetzung. Die monodispersen Partikel wiesen eine quasisphärische, also eine sphärischen Formen ähnelnde Morphologie auf. Absorptions- und Emissionsspektren der fluoreszierenden Nanopartikel zeigten einen großen *Stokes-Shift* von bis zu 350 nm. In den Emissionsspektren zeigte sich eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums mit steigendem Silberanteil. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese Verschiebung in einem Unterschied in der Partikelgröße oder der Zusammensetzung begründet liegt. Mit Hilfe von  $^1\text{H}$ -NMR- und IR-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass der Ligand mit der Thiolgruppe am Metall gebunden vorliegt. Damit ähneln die hier dargestellten Analyseergebnisse zu bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln in der Literatur beschriebenen reinen Au- und Pd-11-MUA-Nanopartikeln.<sup>[152,169,170,175]</sup> Die an *Shang et al.* angelehnte Synthese<sup>[53]</sup> von Ag:Au-DHLA-Nanopartikeln gelang ebenfalls, jedoch zeigten die dargestellten Nanopartikel erst nach mindestens 72 h Standzeit eine sehr schwache rote Fluoreszenz unter UV-Licht. Partikelgrößen zwischen 2,8 nm und 4,8 nm wurden mittels TEM und DCS ermittelt. Dabei deuteten die DCS-Messungen trotz optisch hinreichender Stabilität der Dispersionen auf Agglomerate oder Aggregate hin. Aus TEM-Aufnahmen konnte auf Grund von sichtbaren Netzebenen auf Kristallinität der Partikel geschlossen werden. Zudem war zu erkennen, dass die Ag:Au-DHLA teilweise unterschiedliche Morphologien aufwiesen. Die schwache Emission der Partikel wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Absorptions- und Emissionsintensitäten nicht linear von der Zusammensetzung der Partikel abhing. Die größte Intensität wurde für Ag:Au-40:60-Nanopartikel gemessen. Um Hinweise auf die Orientierung des Liganden zu erhalten, wurden ATR-Messungen angefertigt. Mit diesen konnte die erwartete Ausbildung einer Thiol-Metall-Bindung bestätigt werden.

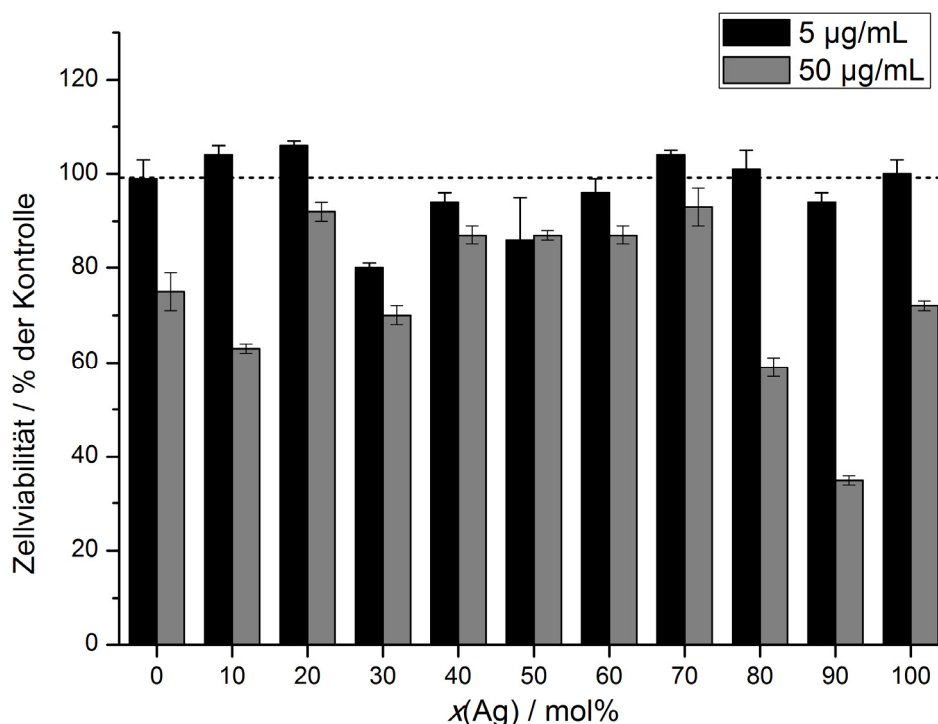
### 4.6 Zellbiologische Untersuchungen mit ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln

Zelluläre Bildgebung und Aufnahmestudien sind sehr prominente Anwendungsgebiete für ultrakleine und besonders fluoreszierende Nanopartikel. Daher ist die Charakterisierung der Partikel hinsichtlich ihrer schädlichen Wirkung auf zelluläre Organismen von essentieller Bedeutung. Dabei wird die Zytotoxizität auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt. In kürzlich veröffentlichten Studien wurde eine deutliche Abhängigkeit der Zellgiftigkeit von der Partikelgröße kleiner und ultrakleiner Goldnanopartikel herausgearbeitet.<sup>[182]</sup> Auch der Ligand kann die Zytotoxizität stark beeinflussen. So zeigten *Polavarapu* et al. eine durchweg niedrige Mortalitätsrate von humanen Neuroblastomen, die mit teilweise sehr hohen Konzentrationen ( $400\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) von Glutathion-stabilisierten Goldclustern inkubiert wurden.<sup>[20]</sup>

Die in dieser Arbeit synthetisierten ultrakleinen Ag:Au-11-MUA-Nanopartikel wurden zellbiologischen Experimenten mit HeLa-Zellen unterzogen. Dabei sollte vor allem eine kompositionsabhängige Toxizität untersucht werden, da ein Zusammenhang der biologischen Wirkung der Partikel und deren Silbergehalt erwartet wurde. Die Zytotoxizität der Partikel wurde mittels MTT-Test analysiert. Dabei wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit Gesamtmetallkonzentrationen von  $5\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$  und  $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  verwendet. Die Partikel wurden vor den Zelltests mehrfach aufgereinigt, um einen potentiellen toxischen Effekt von freiem Ligand und in der Dispersion verbliebenen freien Metallionen auszuschließen. Da die ultrakleinen Partikel unabhängig von ihrer Zusammensetzung nahezu die gleiche Partikelgröße aufwiesen, sollte ein Größeneffekt vernachlässigbar sein. Die Zellexperimente wurden von Frau Diana Kozlova durchgeführt.

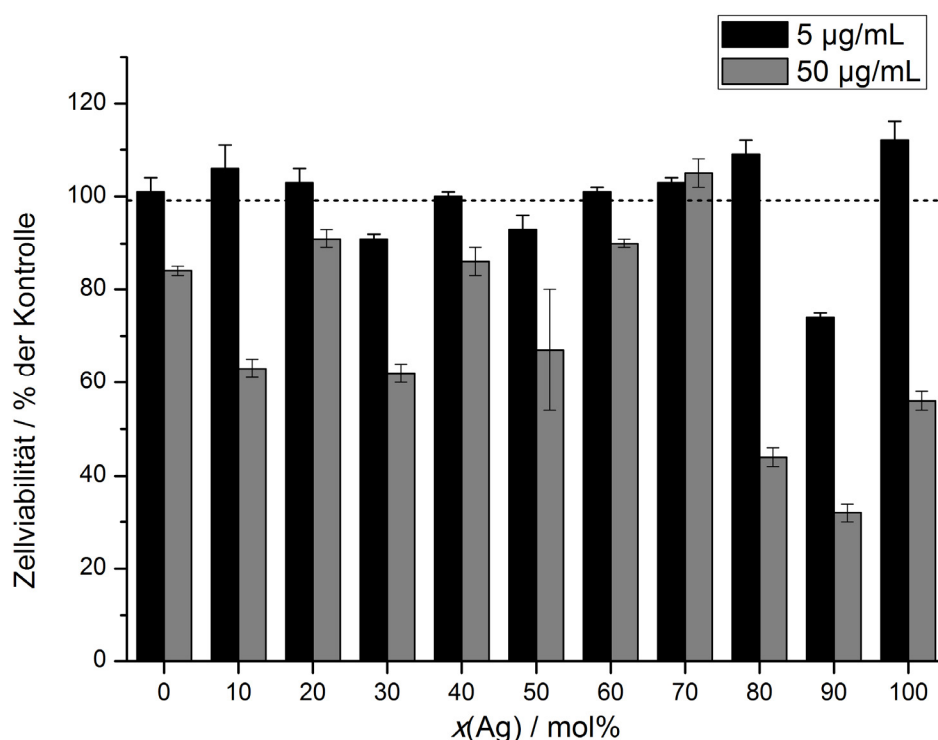
#### 4.6.1 Zelltoxizität von 11-MUA-funktionalisierten ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln gegenüber HeLa-Zellen

In Abbildung 98 ist die mittels MTT-Test ermittelte Zellviabilität der HeLa-Zellen nach 5 h Inkubation mit den zum Vergleich verwendeten Ag- und Au-, sowie den legierten Ag-Au-Nanopartikeln gezeigt. Es ist zu erkennen, dass ein den Erwartungen entsprechender konzentrationsabhängiger toxischer Effekt auftrat. So konnte bei einer verwendeten Gesamtmetallkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  nur für Ag:Au-30:70-Nanopartikel ein zytotoxischer Effekt festgestellt werden. Bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde eine von der Zusammensetzung der Partikel unabhängige Toxizität gefunden. So sank die Zellviabilität für reine Au- und bimetallische Ag:Au-10:90-Nanopartikel auf etwa 70 %, während die Viabilität für Ag:Au-40:60 - Ag:Au-70:30-Nanopartikel nahe bei 90% lag. Partikel mit höherem Silberanteil zeigten wiederum einen stärkeren toxischen Einfluss. Interessanterweise ähnelten die gleich großen reinen Ag-Nanopartikel hinsichtlich der Zytotoxizität den reinen Au-Nanopartikeln.



**Abbildung 98:** Viabilität von HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation mit 11-MUA-funktionalisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.

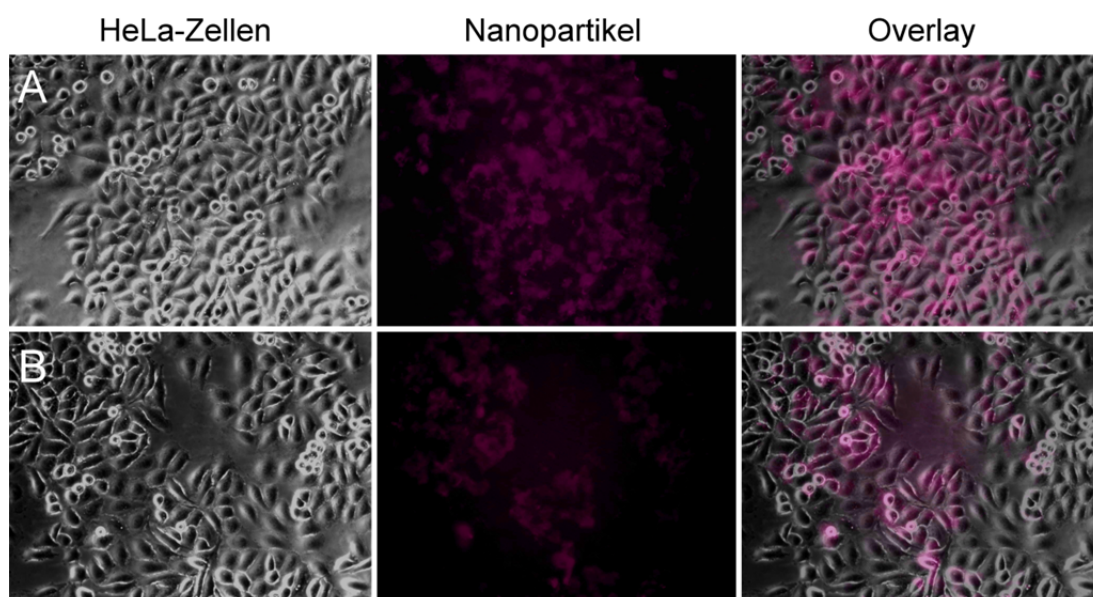
In Abbildung 99 ist die Zellviabilität der HeLa-Zellen nach 72 h Inkubation dargestellt. Nach 72 h konnte nur bei Ag:Au-90:10-Nanopartikeln ein toxischer Effekt bei verwendeter Metallkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  gefunden werden. Im Falle einer Metallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  wurde nach 72 h eine erhöhte Toxizität für ultrakleine Nanopartikel mit hohem Silberanteil gefunden. Während die Viabilität der HeLa-Zellen für Au- und Ag:Au-10:90 - Ag:Au-70:30-Nanopartikel mindestens 60% betrug, sank sie nach Inkubation mit Ag:Au-80-20- und Ag:Au-90:10-Nanopartikeln auf etwa 40%. Reine Ag-Nanopartikel lagen mit 50% verbleibender Zellviabilität dazwischen.



**Abbildung 99: Viabilität von HeLa-Zellen nach 72 h Inkubation mit 11-MUA-funktionalisierten bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln, sowie reinen Ag- und Au-Nanopartikeln. Die gestrichelte Linie gibt die Viabilität der unbehandelten Kontrolle an.**

#### 4.6.2 Aufnahme von 11-MUA-funktionalisierten ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln in HeLa-Zellen

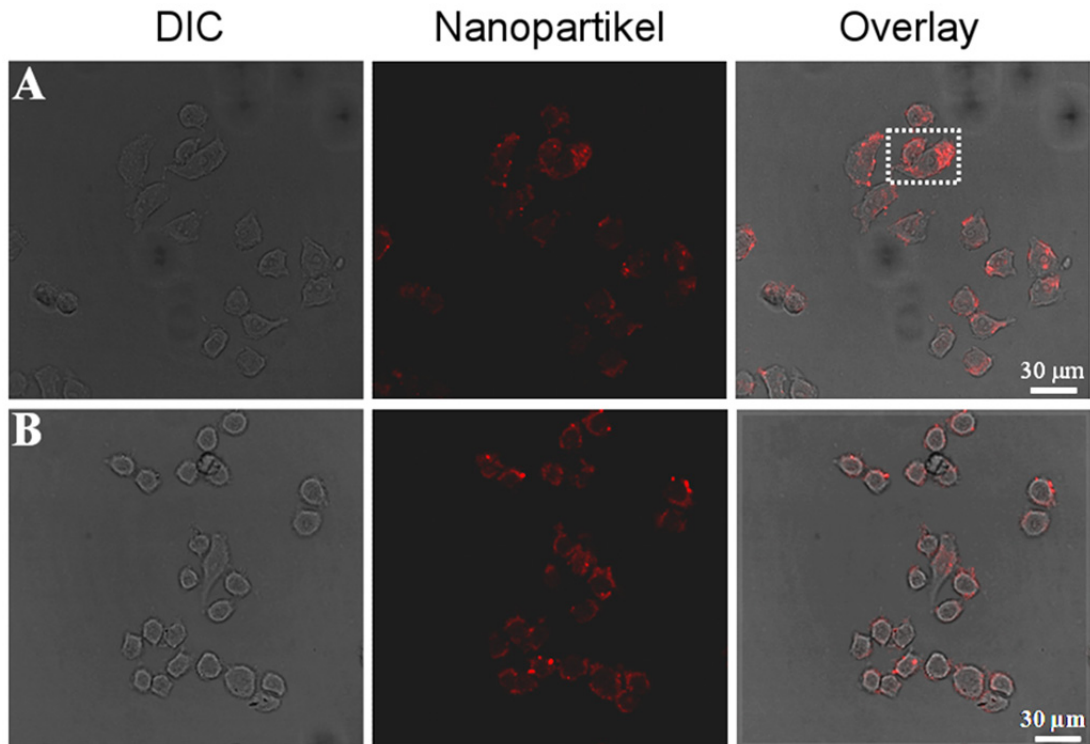
Um die biologische Wirkung von ultrakleinen 11-MUA-funktionalisierten Ag-Au-Nanopartikeln weiter zu charakterisieren und die Aufnahme der fluoreszierenden Partikel zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Ag-Au-Nanopartikeln inkubiert. Um die Eignung der Partikel für konfokale Laserscanningmikroskopie abzuschätzen, wurden vor Anfertigung von CLSM-Aufnahmen zwei Voruntersuchungen durchgeführt, in denen Ag:Au-40:60-Nanopartikel mit HeLa-Zellen inkubiert und mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht wurden. In Abbildung 100 sind zwei fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt, die verdeutlichen, dass die ultrakleinen fluoreszierenden Ag-Au-Nanopartikel für Aufnahmestudien geeignet waren.



**Abbildung 100: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von HeLa-Zellen nach Inkubation mit 80µl Ag:Au-40:60-Dispersion**

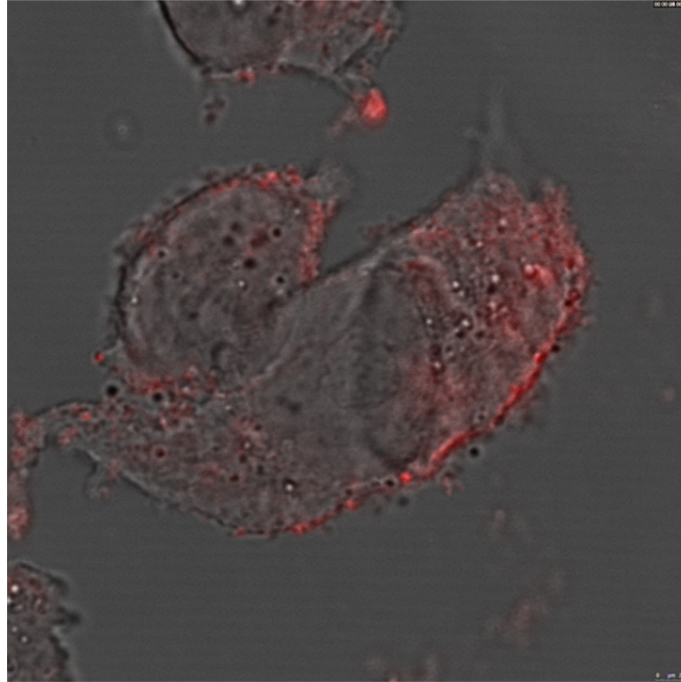
Detaillierte Aufnahmestudien wurden daraufhin mit einer Gesamtmetallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  an 11-MUA-stabilisierten Ag:Au-30:70- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln an HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 5 h mit den Partikeln in serumfreiem Medium inkubiert und mit konfokaler Laserscanningmikroskopie analysiert. Serumfreies Medium wurde bevorzugt, um eine Interaktion von Serumproteinen mit den Nanopartikeln zu verhindern, die in Form einer protektiven Corona die

Nanopartikeloberfläche von Wechselwirkungen mit den Zellen abschirmen können.<sup>[91,148]</sup> In Abbildung 101 ist zu erkennen, dass die bimetallicen Nanopartikel zu großen Teilen an der Zellmembran lokalisiert waren.



**Abbildung 101: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:Ag-Au-30:70-11-MUA- (A) und Ag:Ag-Au-50:50-11-MUA- (B) Nanopartikeln für 5 h in serumfreiem Medium. DIC: Differentieller Interferenzkontrast. Der weiß umrandete Ausschnitt ist in Abbildung 102 in vergrößerter Form dargestellt.**

In Abbildung 102 ist ein vergrößerter Ausschnitt des Overlays von A aus Abbildung 101 gezeigt. Hier ist die Akkumulation der Partikel an der Zellmembran deutlich zu erkennen. Auch in weiteren Bereichen der Zelle war eine Fluoreszenz der Partikel zu beobachten. Allerdings war auf Grund der durch die ultrakleine Partikelgröße bedingten relativ diffusen Fluoreszenz eine Identifizierung von individuellen Partikeln oder eine konkrete Lokalisierung nicht möglich.

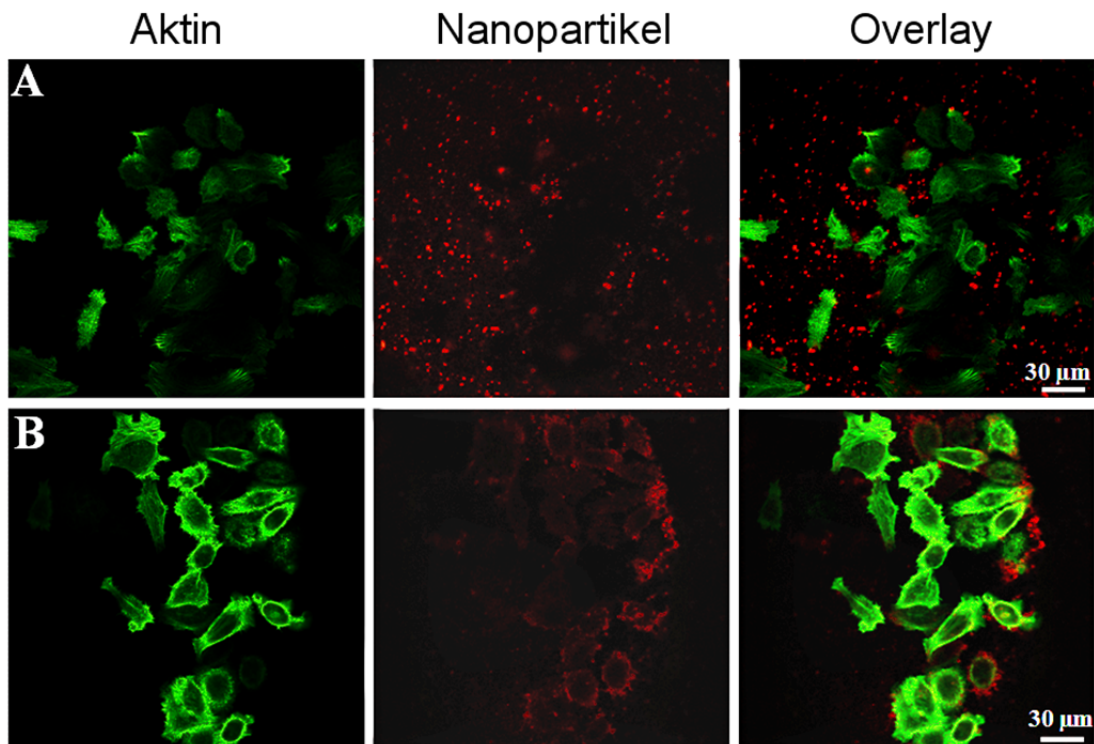


**Abbildung 102: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 101 A: HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:Au-30:70-11-MUA-Nanopartikeln.**

Um den Effekt der Proteinadsorption auf der Nanopartikeloberfläche zu untersuchen, wurde eine Aufnahmestudie von Ag:Au-30:70- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln in Zellmedium mit Zusatz von 10% FCS durchgeführt. Die HeLa-Zellen wurden mit beiden Sorten Nanopartikeln für jeweils 5 h und 24 h inkubiert. Um eine Lokalisierung der Partikel zu veranschaulichen, wurden die Aktinfilamente der HeLa-Zellen mit Alexa Fluor-488-Phalloidin angefärbt. In Abbildung 103 sind CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach 5 h Inkubation mit Ag:Au-30:70-11-MUA- und Ag:Au-50:50-11-MUA-Nanopartikeln gezeigt. Ein Vergleich zwischen den Aufnahmen aus serumfreiem Medium (Abbildung 101 und 102) und solchen aus Aufnahmestudien unter Zusatz von 10% FCS (Abbildungen 103 und 104) zeigt, dass die Partikel in Anwesenheit von Serumproteinen weniger stark an der Zellmembran lokalisiert vorliegen. *Shang* et al. zeigten an Studien mit Ag-Nanopartikeln, dass die Anwesenheit von Serumproteinen die Anzahl der von Zellen internalisierten Partikeln deutlich reduziert.<sup>[91]</sup> Dies könnte mit einer erhöhten Stabilität der Nanopartikel durch die Ausbildung einer Proteincorona erklärt werden.<sup>[106]</sup> Diese führt zu einer verlangsamen Aufnahme oder Akkumulation an der Membran und somit zu einer



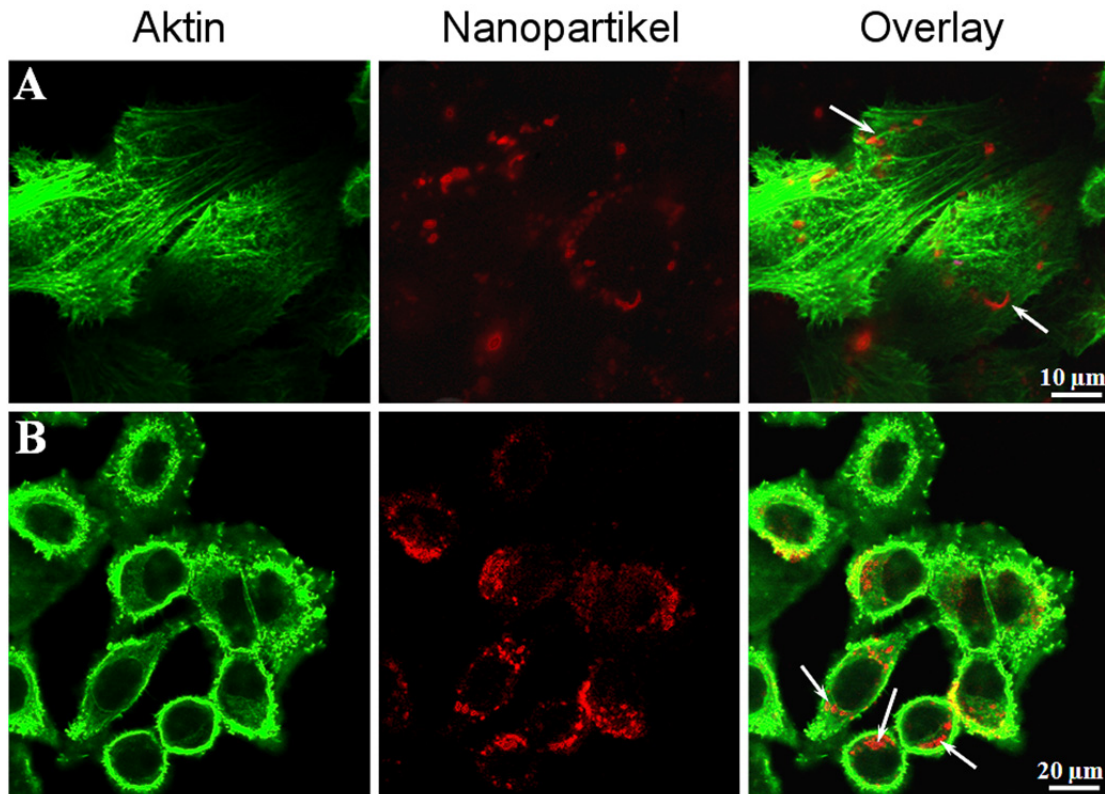
verringerten Anzahl an deutlich lokalisierbaren Fluoreszenzsignalen der ultrakleinen Partikel.



**Abbildung 103: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:Au-30:70-11-MUA- (A) und Ag:Au-50:50-11-MUA- (B) Nanopartikeln für 5 h.**

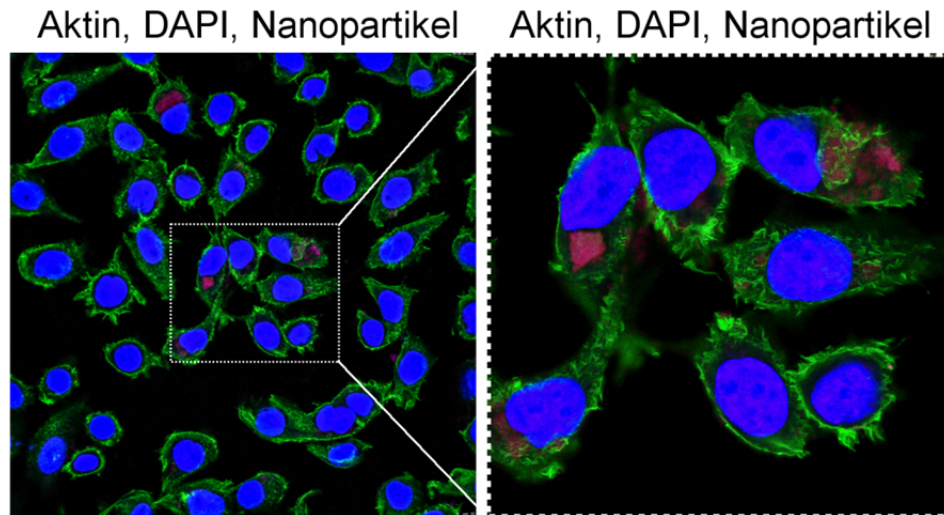
Nach 24 h Inkubation der HeLa-Zellen mit Ag:Au-30:70- und Ag:Au-50:50-Nanopartikeln in Medium mit Zusatz von 10% FCS ist auf den CLSM-Aufnahmen eine Rotfärbung des Zytosols zu erkennen. In Abbildung 104 sind zwei repräsentative CLSM-Aufnahmen dargestellt. Die rote Fluoreszenz der Partikel war entlang der Membran und um den Zellkern am stärksten ausgeprägt. Auf dem Overlay erschwert die starke grüne Fluoreszenz des gefärbten Aktins allerdings eine Lokalisierung der Partikel. Zu beachten ist, dass die sehr hellen, leuchtend rot fluoreszierenden Punkte in den Zellen nicht von individuellen Partikeln, sondern wahrscheinlich von einer großen Anzahl von in endosomalen Vesikeln akkumulierten Partikeln herrühren.<sup>[183]</sup>





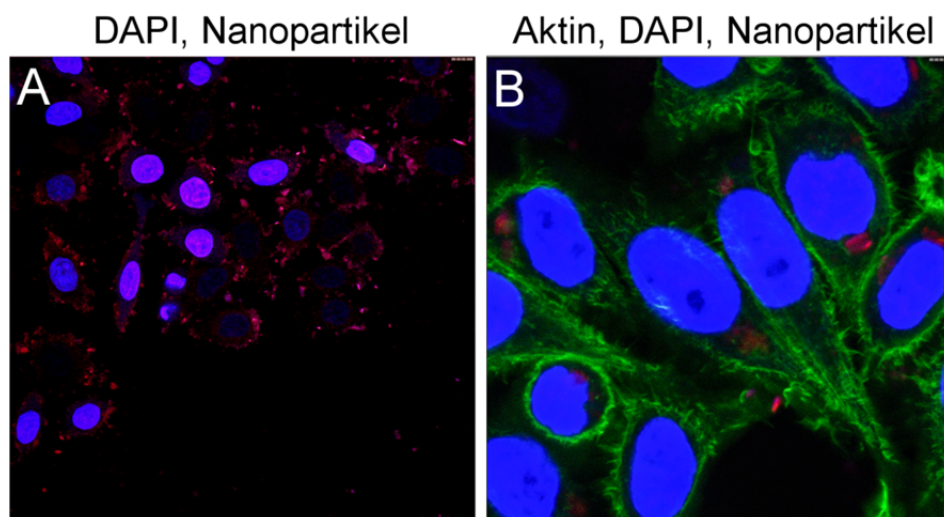
**Abbildung 104:** CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:Au-30:70-11-MUA- (A) und Ag:Au-50:50-11-MUA- (B) Nanopartikeln für 24 h.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden weitere Aufnahmestudien mit HeLa-Zellen und Ag:Au-40:60-, sowie Ag:Au-50:50-Nanopartikeln in Anwesenheit von Serumproteinen durchgeführt. Die Zellen wurden für 7 h mit jeweils beiden Sorten Nanopartikel inkubiert und zur Bildgebung die Aktinfilamente der HeLa-Zellen mit Alexa Fluor-488-Phalloidin, sowie die Zellnuklei mit DAPI angefärbt. Auf vergleichenden Aufnahmen wurde nur der Zellkern mit DAPI angefärbt, um an der Zellmembran akkumulierte Partikel besser sichtbar zu machen. In den in Abbildung 105 dargestellten CLSM-Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass die rot fluoreszierenden Ag:Au-40:60-Nanopartikel in hoher Zahl im Zytosol vorliegen. Die Partikel scheinen allerdings nicht die Kernmembran durchdrungen zu haben, da innerhalb der Zellkerne keine rote Fluoreszenz sichtbar war.



**Abbildung 105: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:40:60-11-MUA-Nanopartikeln für 7 h**

Da die Phalloidininfärbung des Aktins die Identifizierung von Ag-Au-Nanopartikeln in Zellmembrannähe stark erschwerte, wurden Aufnahmen ohne Aktinfärbung angefertigt. Auf den in Abbildung 106 dargestellten CLSM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Partikel nicht ausschließlich im Zytosol, sondern auch in großer Zahl direkt an der Membran akkumuliert vorliegen. Diese Beobachtung stützt die in den vorherigen Aufnahmestudien gefundenen Ergebnisse.



**Abbildung 106: CLSM-Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit Ag:50:50-11-MUA-Nanopartikeln für 7 h**

#### **4.6.3 Zusammenfassung der zellbiologischen Untersuchungen von Ag:Au-11-MUA-Nanopartikeln**

In den zellbiologischen Untersuchungen an ultrakleinen bimetallic Ag-Au-Nanopartikeln zeigte sich, dass die Inkubation von HeLa-Zellen mit den Partikeln über 24 h bei einer Metallkonzentration von  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  unabhängig von der Partikelzusammensetzung nahezu keine Viabilitätsverminderung zur Folge hatte. Eine Exposition der Zellen gegenüber einer Gesamtmetallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  an Ag-Au-Nanopartikeln führte zu einem nichtlinear vom Silbergehalt der Partikel abhängenden Abfall der Zellviabilität. Die Toxizität der Partikel lag bei den meisten Partikelsorten unterhalb von 50%. Ausschließlich Partikel mit einem sehr hohen Silberanteil (Ag:Au-80:20 und Ag:Au-90:10) führten zu einer Verringerung der Zellviabilität auf etwa 40% und zeigten somit höhere Toxizität als reine Ag-Nanopartikel. Aufnahmestudien an HeLa-Zellen zeigten, dass die Nanopartikel über einen Zeitraum von 24 h von den Zellen internalisiert werden. Die Fluoreszenz der ultrakleinen Partikel ist ausgeprägt genug, um eine Verwendung als bildgebender Bestandteil von Aufnahmestudien mit Nanopartikeln unterschiedlicher Ag:Au-Komposition in Betracht zu ziehen.

### **5. Zusammenfassung**

Das Ziel der Arbeit bestand in der Etablierung von Ag-Au-Nanopartikelsynthesen in wässrigem Medium und der anschließenden ausgiebigen Charakterisierung der Partikel, sowie der Untersuchung der Zytotoxizität der dargestellten Nanopartikel.

In Anlehnung an die bekannte *Turkevich*-Methode und vergleichbare Synthesen von Ag-Au-Nanopartikeln konnten über eine Co-Reduktion von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  mit Trinatriumcitrat in Reinstwasser bimetallic Ag:Au-Citrat-Nanopartikel dargestellt werden. Auf Grund mangelnder Stabilität gegenüber Zentrifugalkräften und der daraus resultierenden Ermangelung an Aufreinigungsmöglichkeiten wurden die Partikel mit PVP umfunktionalisiert. Dadurch konnten stabile aufgereinigte sphärische Ag-Au-Nanopartikel in neun verschiedenen Zusammensetzungen dargestellt werden. Die analytisch ermittelte Zusammensetzung der Ag-Au-Nanopartikel entsprach nahezu der

theoretischen Zusammensetzung. Mittels UV-Vis-Spektroskopie wurde ein hoher Legierungscharakter der Partikel nachgewiesen. Da zwischen Nanopartikelsystemen unterschiedlicher Zusammensetzung teilweise deutliche Größenunterschiede auftraten, wurde ein Reduktionsprozess mit einer Mischung aus Citrat und Tannin untersucht. Mit der für reine Goldpartikel bereits etablierten Synthese konnten sphärische Ag-Au-Nanopartikel mit guter Monodispersität und erhöhter Stabilität dargestellt werden, die sich über Ultrazentrifugation aufreinigen ließen. Die theoretische Zusammensetzung der Partikel wurde mit guter Übereinstimmung analytisch bestätigt. Im Vergleich zu den Citrat-stabilisierten Partikeln waren die mittels Citrat/Tannin-Reduktion dargestellten Nanopartikel deutlich kleiner. Ein zusammensetzungsabhängiger Größentrend war erkennbar, der sich in steigender Partikelgröße bei zunehmendem Silberanteil äußerte. Einen Grund dafür könnte die unterschiedliche Reduktionsgeschwindigkeit von  $\text{Ag}^+$  und  $\text{Au}^{3+}$  darstellen. Die Citrat/Tannin-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikel konnten mit PVP und TPPTS umfunktionalisiert und aufgereinigt werden. Der Ligandenaustausch wurde mit Hilfe von kolloidchemischen Analysemethoden nachgewiesen. Über UV-Vis-Spektroskopie und HR-TEM (STEM, HAADF) konnte gezeigt werden, dass die Nanopartikel zwar einen deutlichen Legierungscharakter aufwiesen, die Verteilung der Metalle innerhalb einzelner Partikel allerdings nicht vollständig homogen war. Der Einfluss der Reduktionsmittelkonzentration an Citrat und Tannin wurde im Zusammenhang mit der resultierenden Partikelgröße untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Reduktionsmittelkonzentration zu größeren Partikeln führte, während eine Erhöhung der Konzentration die Partikel kleiner werden ließ. Mit einer im Vergleich zur Standardsyntheseroute 1,5-fach erhöhten Reduktionsmittelkonzentration an Citrat und Tannin konnten Ag-Au-Nanopartikel in neun Zusammensetzungen dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Ag:Au-Partikel im Vergleich zu der regulären Citrat/Tannin-Reduktion kleinere Partikeldurchmesser aufwiesen und nahezu kein zusammensetzungsabhängiger Größentrend mehr zu beobachten war. Mit röntgenpulverdiffraktometrischen Analysen und TEM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die mit erhöhter Reduktionsmittelkonzentration dargestellten Ag-Au-Nanopartikel

nanokristallin und nicht verzwilligt waren. Es wurde außerdem eine signifikante Kontraktion der Elementarzelle beobachtet, was zu einer Abweichung von der *Vegard*-Regel und der Ausbildung von Mikrostress im Gitter der Ag:Ag-Au-Partikel führte. In zellbiologischen Untersuchungen wurde eine nichtlinear vom Silbergehalt der Partikel abhängige Toxizität gegenüber HeLa-Zellen und hMSCs beobachtet. Während Partikel mit hohem Goldanteil nur eine geringe toxische Wirkung zeigten, wiesen Partikel der Zusammensetzung Ag:Ag-Au-80:20 eine maximale Toxizität von nahezu 100 % nach 24 h Inkubation auf (Gesamtmetallkonzentration hMSCs:  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , HeLa-Zellen:  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Des Weiteren konnten ultrakleine Ag-Au-Nanopartikel in der Größenordnung von Clustern über eine Reduktion mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Thiolliganden dargestellt werden. Als Liganden wurden 11-Mercaptoundecansäure und Liponsäure verwendet. Die monodispersen 11-MUA-stabilisierten Ag-Au-Nanopartikel konnten über eine Fällungsreaktion aufgereinigt werden und wiesen quasisphärische Morphologie und eine von der Zusammensetzung unabhängige Partikelgröße auf. Die theoretische Zusammensetzung der Partikel wurde mittels AAS bestätigt. Mit Hilfe von ATR- und  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnte die Ligandenorientierung nachgewiesen werden. Partikel mit einer Zusammensetzung zwischen Ag:Ag-Au-10:90 und Ag:Ag-Au-60:40 zeigten eine deutliche Autofluoreszenz unter UV-Licht. Die Emissionswellenlänge hing vom Silbergehalt ab und wies eine Rotverschiebung mit zunehmendem Silberanteil auf. Zellbiologische Untersuchungen an HeLa-Zellen ergaben nach 24 h Inkubation mit den ultrakleinen Ag:Ag-Au-11-MUA-Nanopartikeln zumeist über 50% Viabilität (Gesamtmetallkonzentration von  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Nur Partikel mit sehr hohem Silberanteil zeigten höhere Toxizität. In Aufnahmestudien konnte gezeigt werden, dass die Ag:Ag-Au-11-MUA-Nanopartikel an der Zellmembran und wahrscheinlich in endosomalen Vesikeln akkumulierten.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Analytik

Das folgende Kapitel gibt eine Übersicht über die verwendeten Analysemethoden sowie die zugehörigen theoretischen Grundlagen. Neben den einzelnen Geräten werden auch die entsprechenden Probenpräparationen beschrieben.

#### 6.1.1 Mikroskopische Methoden

##### 6.1.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

###### 6.1.1.1.1 Theoretischer Hintergrund

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) ist ein Elektronenmikroskop, in dem die zu untersuchende Probe mit Elektronen durchstrahlt wird. Der zur Mikroskopie benötigte Elektronenstrahl wird aus einer Glühkathode, bestehend aus einem Wolfram Haarnadelfilament, oder einem LaB<sub>6</sub>-Emitter umgeben von einem *Wehnelt*-Zylinder emittiert. Alternativ wird eine Feldemissionskathode, bestehend aus einem Wolframfilament, umgeben von einer Extraktorelektrode an der positives Potential anliegt, verwendet. Durch ein parallel zur optischen Achse angelegtes elektrisches Feld werden die emittierten Elektronen im Ultrahochvakuum beschleunigt. Das Feld wird erzeugt, indem in der Kathode durch Anlegen von Hochspannung, typischerweise zwischen 80 und 400 kV, ein hohes negatives Potential erzeugt wird. Die Anode, welche unterhalb der Kathode angebracht ist, weist hingegen Bezugspotential auf. Mit Hilfe eines Systems elektromagnetischer Kondensorlinsen wird der Strahl auf die Probenebene fokussiert. Beim Durchleuchten der Probe kommt es zur Streuung der einfallenden Elektronen. Mit Hilfe von Blenden und Objektiven kann ein Zwischenbild des Beugungskontrastes der elastisch gestreuten Elektronen aufgefangen werden, welches auf einem Detektorschirm abgebildet wird. Dieses vergrößerte Bild kann auf einem fluoreszenten Schirm oder einem fotografischen Film abgelichtet oder mittels CCD-Kamera an einen Computer gesendet und weiter bearbeitet werden.<sup>[184]</sup> Für die Transmissionselektronenmikroskopie muss die Dicke der aufgebrauchten

Probe im Bereich von Nano- bis wenigen Mikrometern liegen. Die Probenpräparation, etwa ein Auftragen auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfernetz oder das Einbetten in Kunstharz und anschließende Anfertigen von Mikrotomschnitten, ist somit zwingende Voraussetzung für Bilder mit guter Auflösung.

#### **6.1.1.1.2 HR-TEM, STEM, EDX und HAADF**

Eine besondere Abbildungsvariante im TEM ist die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HR-TEM). In diesem Fall beruht die erzeugte Abbildung auf Interferenzen zwischen den Elektronenwellen des Primärstrahls und den transmittierten Austrittselektronenwellen, welche beim Auftreffen auf das Probenmaterial eine Phasenänderung erfahren. Aus den daraus erhaltenen Informationen werden sogenannte Phasenkontrastbilder generiert. Da die optischen Linsen des Mikroskops ebenfalls zu Phasenverschiebungen bzw. sphärischer und chromatischer Aberration führen, muss eine Aberrationskorrektur vorgenommen werden, um ein aussagekräftiges Bild zu erhalten. Eine weitere Sonderform des TEM ist das Rastertransmissions-elektronenmikroskop (STEM). In dieser Form der Transmissionselektronen-mikroskopie wird der Elektronenstrahl auf einen Punkt in der Ebene der zu untersuchenden Probe fokussiert. Die Probe wird anschließend zeilenweise abgerastert. Durch den Rasterprozess bedingt werden weitere Analysetechniken zugänglich, so etwa EDX-Mapping oder HAADF-Messungen.<sup>[184]</sup> Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Elektronenhüllen des Probenmaterials kann es zur Emission von Röntgenstrahlung aus der Probe kommen, wenn der Elektronenstrahl kernnahe Elektronen der Probe herausschlägt und diese von Elektronen aus höheren Niveaus unter Emission eines Röntgenquanten ersetzt werden. Die Energie der Röntgenstrahlung ist abhängig vom jeweiligen Elektronenübergang innerhalb der Hülle und charakteristisch für jedes Element. Die Auswertung der von der Probe emittierten Röntgenstrahlung hinsichtlich der elementspezifischen Energie nennt sich energiedispersive Röntgenemissionsspektroskopie (EDX) und liefert die qualitative und semi-quantitative Elementzusammensetzung der Probe. Im STEM kann durch das Abrastern und simultane EDX-Messung eine lokale Verteilung der Elemente

in direkter Korrelation mit dem Abbild der Probe gemessen werden (EDX-Mapping). Im STEM kann des Weiteren ein besonderer Detektor, der sogenannte *high-angle annual dark field* (HAADF) Detektor, verwendet werden. Dieser kreisförmige Dunkelfelddetektor ist unterhalb der Probenebene angeordnet und misst die weitwinklig gestreuten Elektronen nach Transmission durch die Probe. Da im weitwinkligen Bereich die Intensität der Streuung proportional zum Quadrat der Ordnungszahl des streuenden Elements ist, weisen HAADF-Bilder einen sehr hohen Ordnungszahlkontrast (z-Kontrastbild) auf und können so zur Analyse von Elementverteilung innerhalb der Probe verwendet werden.<sup>[184,185]</sup>

### 6.1.1.1.3 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

Die TEM-Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit einem Philips CM 200 FEG angefertigt. Die zu untersuchenden Dispersionen wurden mit Reinstwasser auf geeignete Konzentrationen verdünnt, auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes engmaschiges Kupfernetz getropft und an der Luft getrocknet. Die TEM-Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Wolfgang Meyer-Zaika am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Hochauflösende TEM-Aufnahmen (HRTEM) wurden an der Fakultät für Physik der Universität Duisburg-Essen, Arbeitsgruppe Prof. Farle, mit einem FEI Tecnai F20 Mikroskop, ausgestattet mit einem *high-angle annual dark field* (HAADF) Detektor und einem energiedispersiven Röntgenspektrometer (EDX) aufgenommen. Die zu untersuchenden Dispersionen wurden mit Reinstwasser auf geeignete Konzentrationen verdünnt, auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes engmaschiges Kupfernetz getropft und an der Luft getrocknet. Die HR-TEM-Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Zi-An Li angefertigt.



### 6.1.1.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

#### 6.1.1.2.1 Theoretischer Hintergrund

Mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) kann die zu untersuchende Probe mit einem Elektronenstrahl abgerastert werden. Ist die Probe selbst nicht leitend, so wird sie vor Anfertigen der Bilder mit einer wenige Nanometer dicken Metallschicht (z.B. Au, Pd oder Cr) bedampft. Der für die Mikroskopie erforderliche Elektronenstrahl wird mit einer Glühkathode aus einem Wolfram Haarnadelfilament oder einem LaB<sub>6</sub>-Emitter umgeben von einem *Wehnelt*-Zylinder erzeugt. Eine Feldemissionskathode, bestehend aus einem Wolframfilament umgeben von einer Extraktorelektrode ist eine alternative Quelle für den Elektronenstrahl. Dieser Strahl wird mit magnetischen Linsen auf wenige Nanometer fokussiert und im Hochvakuum über die Oberfläche der Probe geführt. Der Durchmesser des Fokuspunktes bestimmt dabei automatisch die räumliche Auflösung des Elektronenmikroskops. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls treten Wechselwirkungen mit den Atomen der Probe auf, welche von verschiedenen Detektoren ausgewertet werden können. Ein am Detektor angeschlossener Photomultiplier (PMT) verstärkt das Signal, welches anschließend in Form des Bildes auf einem Computer dargestellt werden kann. Die auftreffenden Elektronen des Primärstrahls erfahren sowohl elastische Streuung durch elektrostatische Wechselwirkung mit den Atomkernen der Probe, als auch inelastische Streuung an den Elektronenhüllen der Probenatome. Ein geringer Teil der elastisch gestreuten Primärelektronen werden in Winkeln von  $\theta > 90^\circ$  zurückgestreut, können auf Grund ihres vernachlässigbar geringen Energieverlusts wieder in das umgebende Vakuum eintreten und vom BSE-Detektor aufgefangen werden (*backscattered-electron*, BSE). Inelastisch gestreute Elektronen dringen größtenteils in das Probenmaterial ein, verlieren ihre kinetische Energie und werden letztendlich vom Probenmaterial absorbiert. Da Elemente mit hoher Ordnungszahl eine hohe Dichte aufweisen, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Rückstreuelektronen mit steigender Ordnungszahl und die Anzahl und Eindringtiefe für inelastisch gestreute Elektronen verringert sich. Dies führt zu einer zur Ordnungszahl proportionalen Intensität der

Rückstreuелеktronen und somit einem starken Materialkontrast des resultierenden Bildes. Durch inelastische Streuung der Elektronen des Primärstrahls an schwach gebundenen Valenzelektronen des Probenmaterials kann es zur Emission von Sekundärelektronen kommen, da die Valenzelektronen nach dem Energieerhaltungssatz die kinetische Energie der Primärelektronen aufnehmen und aus der Valenzschale austreten können. Sekundärelektronen, die den Probenkörper in Richtung des umgebenden Vakuums verlassen, können vom Sekundärelektronendetektor (SE) analysiert werden. Da die Tiefe für einen wahrscheinlichen Austritt von SEs auf Grund der potentiellen Streuung an weiteren Probenatomen nur wenige Nanometer beträgt, resultieren die meisten detektierten SEs aus oberflächennahen Atomen. Daher weisen mit einem SE-Detektor aufgenommene REM-Bilder einen starken topographischen Kontrast auf. Die Interpretation dieses Kontrastbildes ist in vielen Fällen eindeutig, da der SE-Detektor zumeist seitlich von der Probe angebracht ist, was zu einer erhöhten Ausbeute an detektierten SEs von dem Detektor zugewandten Flächen der Probe führt. Dadurch erhält das SE-Bild eine hohe dreidimensionale Plastizität. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Elektronenhüllen des Probenmaterials kann es zudem zur Emission von Röntgenstrahlung aus der Probe kommen. Diese entsteht, wenn der Elektronenstrahl kernnahe Elektronen der Probe herausschlägt und diese von Elektronen aus höheren Energieniveaus unter Emission eines Röntgenquanten ersetzt werden. Die Energie der Röntgenstrahlung ist abhängig vom jeweiligen Elektronenübergang innerhalb der Hülle und charakteristisch für jedes Element. Die Auswertung der von der Probe emittierten Röntgenstrahlung hinsichtlich der elementspezifischen Energie nennt sich energiedispersive Röntgenemissionsspektroskopie (EDX) und liefert die qualitative und semi-quantitative Elementzusammensetzung der Probe.

### **6.1.1.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen**

Die in dieser Arbeit dargestellten REM-Aufnahmen wurden mit einem FEI Quanta FEG 400 erstellt. Einige Proben wurden zuvor mit einer Au/Pd-Legierung bedampft. Proben von Dispersionen wurden auf einen Si-Wafer

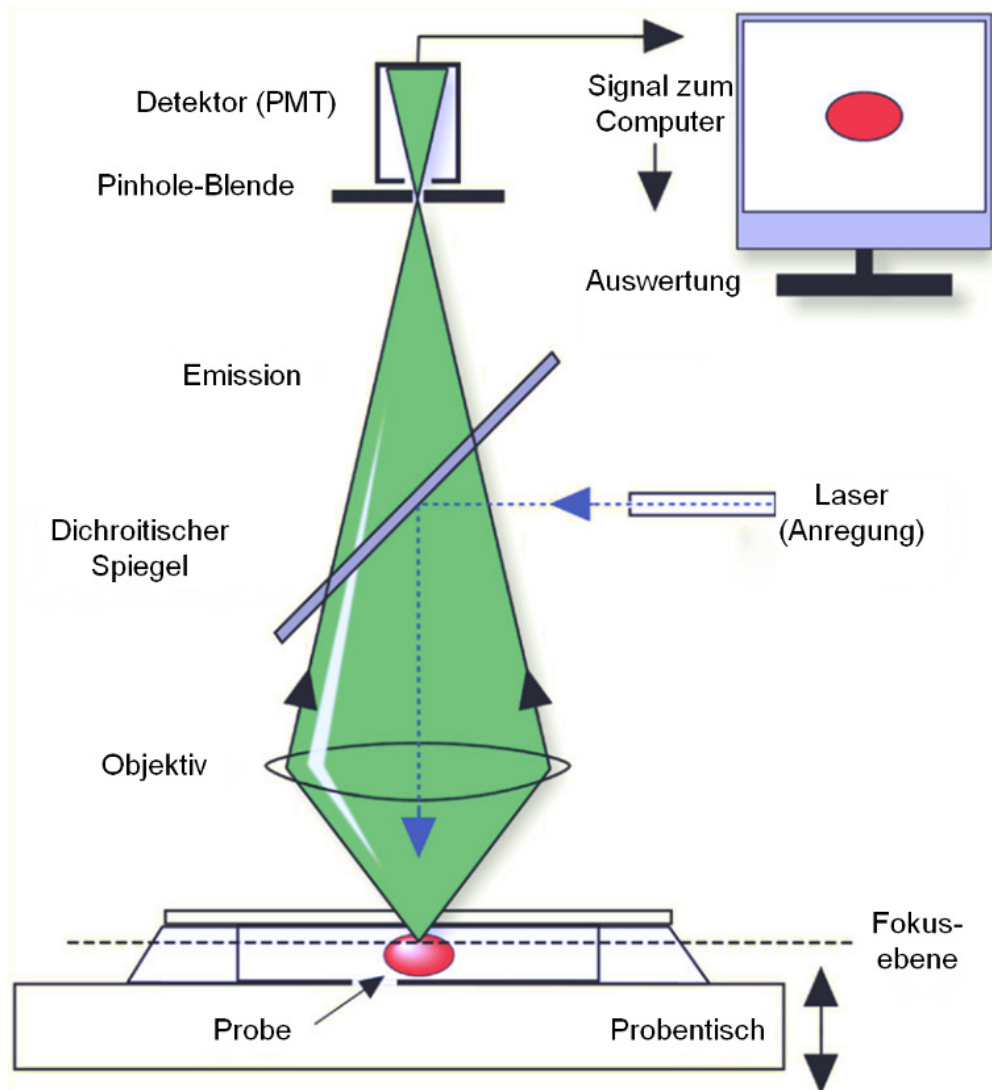
getropft und an der Luft eingetrocknet, solche von festen Proben wurden entweder auf einem Kohlepad fixiert oder mit einem Tropfen Isopropanol auf einem Si-Wafer eingetrocknet. Zur Verbesserung der Leitfähigkeit wurde der Kontakt zwischen Wafer und Probenträger durch Auftragen von Silberleitlack hergestellt. Einige der REM-Aufnahmen wurden von Frau Kateryna Loza erstellt.

### **6.1.1.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)**

#### **6.1.1.3.1 Theoretischer Hintergrund**

Ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) ist eine spezielle Variante eines Aufricht- oder Fluoreszenzmikroskops. Es wird in den meisten Fällen zur Untersuchung von kleinen biologischen Objekten oder Gewebe und zur Anfertigung optischer Serienschnitte durch diese verwendet. Oft dienen als bildgebende Spezies ein oder mehrere Fluoreszenzmarker, mit denen die zu untersuchende Probe angefärbt wird. Als Lichtquelle werden unterschiedliche Laser verwendet, deren Wellenlängen mit Hilfe eines akustooptischen Modulators selektiert werden können. Der Laserstrahl wird durch eine Pinhole-Blende und einen dichroitischen Spiegels auf die zu untersuchende Probe geleitet und mit Hilfe eines Objektivs in einer Fokusebene in der Probe fokussiert. Die Fluorophore werden durch den Laser angeregt und emittieren, durch den *Stokes-Shift* bedingt, längerwelliges Licht, welches den dichroitischen Spiegel passieren kann. Das emittierte Licht trifft durch einen Filter und eine weitere Pinhole-Blende auf einen Detektor mit Photomultiplier. Das Besondere am Aufbau des Mikroskops ist, dass der Fokus des Lasers nur in einem sehr kleinen Punkt innerhalb einer Fokusebene liegt, die abgerastert werden kann. Dadurch kommt es zu einer starken Emission der Fluorophore im Fokus, während Farbstoffmoleküle außerhalb des Fokus nur diffus emittieren. Der Fokuspunkt auf der Probe und der Durchlass in der Pinhole-Blende vor dem Detektor sind konfokal zueinander angeordnet, was dazu führt, dass jegliches Licht, welches außerhalb des Fokus emittiert wird, von der Blende abgefangen wird und nicht den Detektor trifft. Durch diese Anordnung können sehr scharfe Bilder mit einer stark erhöhten räumlichen Auflösung generiert werden. Durch die Möglichkeit, die Fokusebene in unterschiedliche Tiefen der Probe zu legen, können optische Serienschnitte

der Probe angefertigt werden, welche nachträglich zu einer 3D-Rekonstruktion vereint werden können.<sup>[186,187]</sup> In Abbildung 107 ist der schematische Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops dargestellt.



**Abbildung 107: Schematischer Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.**<sup>[187]</sup>

### 6.1.1.3.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde im Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen, Arbeitsgruppe Prof. Knauer, mit einem Leica TCS SP5 mit 63x/NA 1.2 Objektiv von Frau Diana Kozlova durchgeführt. Fluoreszenz der Nanopartikel wurde mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 405 \text{ nm}$  angeregt, die Emission wurde durch einen

635 nm Langpassfilter aufgenommen. Die Immunofluoreszenz der Actin-Färbung wurde mit  $\lambda = 488$  nm angeregt.

## 6.1.2 Spektroskopische Methoden

### 6.1.2.1 UV-Vis-Spektroskopie

#### 6.1.2.1.1 Theoretischer Hintergrund

Die UV-Vis Spektroskopie ist eine absorptionsspektroskopische Methode, bei der die Analyten mit Licht aus ultravioletter (UV) und sichtbaren (Vis) Wellenlängenbereich bestrahlt wird. Typischerweise werden Absorptionen von organischen Substanzen in Abhängigkeit von der eingestrahlten Wellenlänge gemessen, um Informationen über elektronische Eigenschaften der zu untersuchenden Moleküle zu erhalten. Die zu untersuchende Probe wird in einer für elektromagnetische Wellen der entsprechenden Wellenlänge durchlässigen Küvette, typischerweise aus speziellem Quarzglas, in einen Strahlengang gebracht. Dieser wird von der Lichtquelle ausgehend, z.B. einer Deuterium- oder Xenonlampe, durch einen Monochromator und einen Sektorspiegel abwechselnd durch die Probe und durch eine Referenzküvette geleitet. Die Referenzküvette enthält das reine Lösungsmittel der zu untersuchenden Probe. Die beiden Strahlengänge werden in einem Detektor vereint, der die Intensität beider Signale aufzeichnet und somit Absorptionen der Probe ausgeben kann. Mit Hilfe des Monochromators kann ein kontinuierliches Durchstimmen der Wellenlänge erreicht werden. Absorptionen in organischen Molekülen kommen zustande, wenn die eingestrahlte Wellenlänge der Energie eines elektronischen Übergangs im Analyten entspricht. Die elektronischen Übergänge finden zwischen den bindenden oder nichtbindenden HOMOS (*highest occupied molecular orbital*) und LUMOS (*lowest unoccupied molecular orbital*) bestimmter funktioneller Gruppen des Moleküls statt ( $n \rightarrow \pi^*$  oder  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Da die Übergänge vom elektronischen und Schwingungsgrundzustand des Moleküls, in dem es sich bei Standardbedingungen typischerweise befindet, sowohl in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes, als auch in beliebige angeregte Schwingungszustände des elektronisch angeregten Zustandes erfolgen kann, weisen die Absorptionsspektren keine schmalen

Linien für diskrete Wellenlängen auf, sondern zeigen breite Absorptionsbanden, deren Intensitätsverteilung gemäß dem *Franck-Condon*-Prinzip gegeben ist. Da der Anteil des durch den Analyten absorbierten Lichts einer bestimmten Wellenlänge nach dem Lambert-Beer-Gesetz (Gleichung 3) direkt proportional zur Anzahl an Analytmolekülen ist, lassen sich aus UV-Vis-Spektren mit Hilfe von Kalibrationsmessungen absolute Konzentrationen bestimmen.<sup>[188]</sup>

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c d = A \quad (\text{Gleichung 3})$$

$I_0, I$  : Lichtintensität vor und nach Bestrahlen des Analyten

$\varepsilon$  : Absorptionskoeffizient

$c$  : Konzentration des absorbierenden Stoffs

$d$  : Schichtdicke des durchstrahlten Mediums

$A$  : Spektrales Absorptionsmaß

Einige Nanopartikelspezies zeigen Oberflächenplasmonenresonanz und lassen sich daher ebenfalls mittels UV-Vis-Spektroskopie analysieren. Hierbei werden durch die Absorption von elektromagnetischen Wellen die Oberflächenplasmonen angeregt. Die Form der Plasmonenabsorptionsbande und die Lage des Maximums können Hinweise auf Morphologie, Partikelgröße, bestimmte Oberflächenvorgänge und Dispersität der Probe geben.

### 6.1.2.1.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

Die UV-Vis-Spektren wurden mit einem Varian Cary 300 UV-Vis Bio Spektrometer in Suprasil-Quarzglasküvetten der Firma Hellma mit 1 cm Schichtdicke und 3,5 mL Volumen gemessen. Für Proben mit geringem Volumen wurden Suprasil-Quarzglas-Mikroküvetten der Firma Hellma mit 1 cm Schichtdicke und 850 µL Volumen verwendet.

### 6.1.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

#### 6.1.2.2.1 Theoretischer Hintergrund

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine absorptionsspektroskopische Methode, bei der die Analyten mit elektromagnetischer Strahlung, deren Wellenlänge typischerweise zwischen 200 nm und 1000 nm liegt, bestrahlt und die nach Absorption der Strahlung auftretende Emission der Probe aufgezeichnet wird. Wenn ein Molekül oder Partikel durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung elektronisch angeregt wird, so können im Folgenden unterschiedliche Relaxationsvorgänge stattfinden. Lumineszenz tritt auf, wenn, im Gegensatz zur häufig stattfindenden strahlungslosen Relaxation durch z.B. Vibration und Wärmeübertragung an umgebendes Medium, die Anregungsenergie durch Emission eines Photons wieder abgegeben wird. Die Anregung eines Elektrons aus dem elektronischen Singulett-Grundzustand  $S_0$  und den dazugehörigen vibronischen Zuständen erfolgt in Übereinstimmung mit dem *Franck-Condon-Prinzip* innerhalb von etwa  $10^{-15}$  s und kann in einen angeregten Singulett-Zustand  $S_1$ ,  $S_2$ , etc. oder über *Intersystem Crossing* in einen angeregten Triplett-Zustand  $T_1$ ,  $T_2$ , etc. und dazugehörige vibronische Niveaus erfolgen. Emission unter spinverbotener Rückkehr aus den angeregten Triplett-Zuständen in  $S_0$  wird Phosphoreszenz genannt und erfolgt nur sehr langsam mit durchschnittlichen Lebensdauern von einigen Millisekunden bis hin zu Minuten. Fluoreszenz, die Emission von Photonen unter Rückkehr von angeregten Zuständen  $S_1$ ,  $S_2$ , etc. in  $S_0$ , weist hingegen durchschnittliche Lebensdauern im Bereich der Nanosekunden auf. Die Anregung aus  $S_0$  erfolgt typischerweise in angeregte vibronische Niveaus der Zustände  $S_1$ ,  $S_2$ , etc. Mit nur wenigen Ausnahmen relaxieren die Moleküle über Vibrationen innerhalb von  $10^{-12}$  s in den vibronischen Grundzustand von  $S_1$ . Dieser Vorgang wird *Internal Conversion* genannt. Die folgende strahlende Relaxation  $S_0$  kann in unterschiedliche vibronische Niveaus von  $S_0$  erfolgen. Durch diese beiden Effekte hat die bei der Fluoreszenz emittierte Strahlung mit nur wenigen Ausnahmen eine geringere Energie bzw. eine größere Wellenlänge als die zur Anregung benötigte Strahlung. Die Beschreibung dieser Diskrepanz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge wird *Stokes-Shift* genannt. Durch die

schnelle Dissipation der Energie in den elektronisch angeregten Zuständen, nach der die Emission des Fluorophors in vielen Fällen aus  $S_1$  erfolgt, bleibt die Emissionswellenlänge unabhängig von der Anregungswellenlänge gleich. Dieses Prinzip wird durch die *Kasha-Vavilov*-Regel beschrieben. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie können sowohl die Emissionsspektren, d.h. die Wellenlängenverteilung der Emission einer Probe bei konstanter Anregungswellenlänge, als auch die Anregungsspektren, d.h. die Abhängigkeit der Intensität einer diskreten Emissionswellenlänge von der Anregungswellenlänge, aufgenommen werden.<sup>[174]</sup> Die zu untersuchende Probe wird in einer für Licht der entsprechenden Wellenlänge durchlässigen Küvette, oft aus speziellem Quarzglas, in einen Strahlengang gebracht. Das Licht wird mit z.B. einer Xenon-Blitzlampe erzeugt, da diese einen sehr weiten Wellenlängenbereich abdeckt. Die auf die Probe gestrahlte Anregungswellenlänge wird mittels Monochromator (Anregungsmonochromator) gewählt und passiert zur Eliminierung von Streulicht mehrere optische Gitter. Vom Analyten emittierte Fluoreszenz wird im  $90^\circ$  Winkel detektiert. Dazu ist in rechtwinkliger Anordnung zum einfallenden Lichtstrahl ein Photomultiplier hinter einen weiteren Monochromator (Emissionsmonochromator) geschaltet. Der Emissionsmonochromator dient dazu, die zu detektierende Emissionswellenlänge gezielt wählen zu können. Ein schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers ist in Abbildung 108 gezeigt.



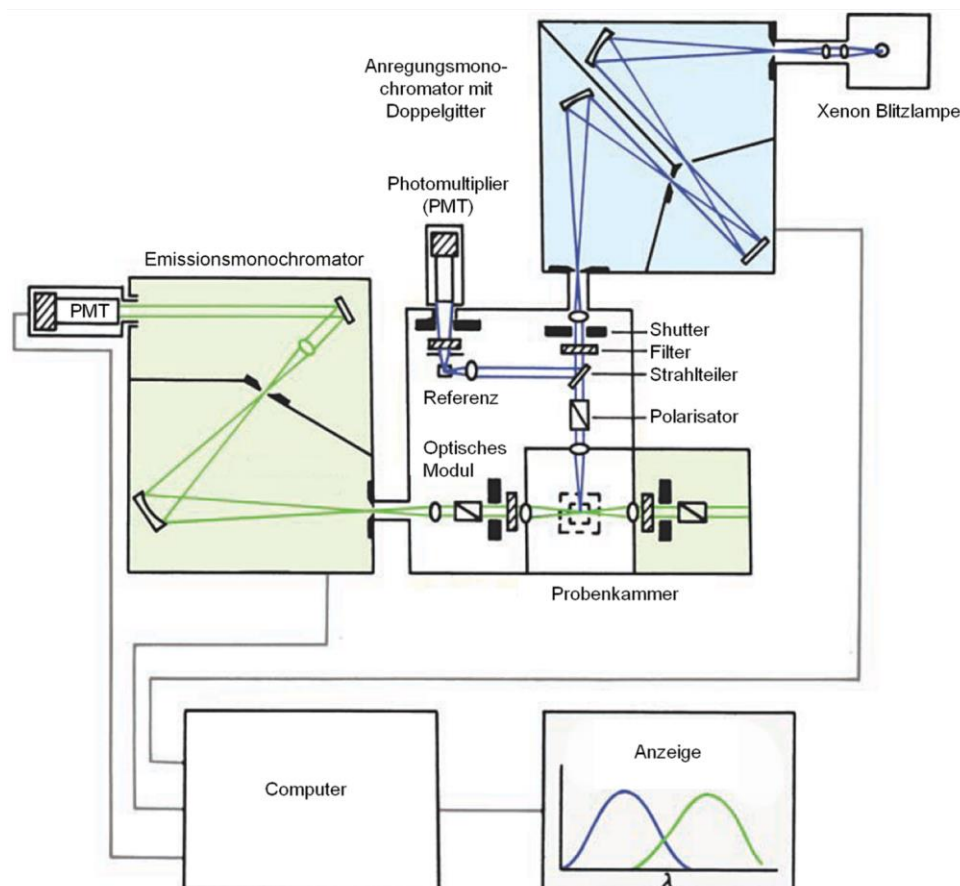


Abbildung 108: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers.<sup>[174]</sup>

#### 6.1.2.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

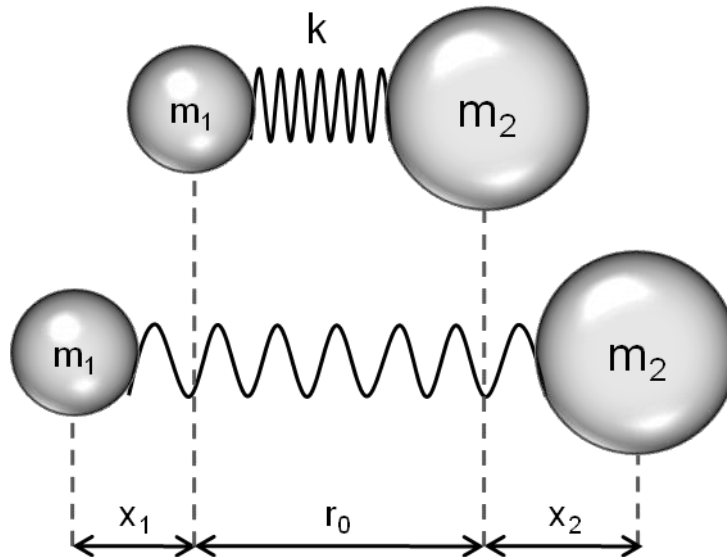
Fluoreszenzspektroskopie wurde mit einem Agilent Cary Eclipse Spektrophotometer und Suprasil-Quarzglasküvetten der Firma Hellma mit 1 cm Schichtdicke und 3500  $\mu\text{L}$  Volumen durchgeführt.

#### 6.1.2.3 Infrarotspektroskopie

##### 6.1.2.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Infrarotspektroskopie ist eine absorptionsspektroskopische analytische Methode, die der Identifizierung funktioneller Gruppen und Erhaltung struktureller Informationen organischer Substanzen dient. Werden Moleküle mit infrarotem Licht bestrahlt, so ändern diese nach Absorption der Strahlung ihre Schwingungszustände. Molekülschwingungen lassen sich mit Hilfe des klassischen Hantelmodells darstellen, in welchem zwei Atome oder Molekülfragmente mit den Massen  $m_1$  und  $m_2$  durch eine Feder miteinander

verbunden sind (Abbildung 109). Durch Anregung von Schwingungen werden die beiden Atome um den Abstand  $x_1+x_2$  aus ihrer Gleichgewichtslage  $r_0$  ausgelenkt.



**Abbildung 109:** Hantelmodell eines zweiatomigen Moleküls im Gleichgewichtszustand  $r_0$  und im ausgelenkten Zustand  $r_0+x_1+x_2$ .<sup>[189]</sup>

Dieser Dehnung wirkt dem *Hooke'schen* Gesetz (Gleichung 4) nach eine Rückstellkraft  $F$  entgegen, die zu einer Schwingung der Atome um die Gleichgewichtslage führt. Dabei ist die Kraftkonstante  $k$  ein Maß für die Stärke der Bindung zwischen den beiden schwingenden Atomen.

$$F = -k \Delta r \quad (\text{Gleichung 4})$$

$F$  : Rücktreibende Kraft

$k$  : Kraftkonstante

$\Delta r$  : Auslenkung

Die Anregung von Molekülschwingungen durch Absorption von infrarotem Licht beruht auf der Wechselwirkung des Dipolmoments des Moleküls mit dem elektrischen Vektor des Lichts. Damit diese Wechselwirkung stattfinden kann, muss sich nach quantenmechanischer Definition für infrarotaktive Schwingungen während der Auslenkung das Dipolmoment des Moleküls ändern. Da bei Raumtemperatur beinahe ausschließlich die

Schwingungsgrundzustände besetzt sind, führt die Absorption des infraroten Lichts zur Anregung von energetisch höherer Schwingungszuständen, die durch  $3N-6$  (bei linearen Molekülen  $3N-5$ ) Schwingungsfreiheitsgrade definiert sind. Schwingungen, die völlig unabhängig voneinander angeregt werden können und von allen anderen Schwingungen des Moleküls entkoppelt sind, bezeichnet man als Normalschwingungen. Die wichtigsten Schwingungsarten zur Charakterisierung eines Moleküls durch Infrarotspektroskopie sind Valenz- und Deformationsschwingungen die funktionelle Gruppen und einzelne Bindungen betreffen. Deren prominenteste Absorptionsbanden liegen oberhalb des Fingerprintbereichs (ab  $1000\text{ cm}^{-1}$ ), in dem hingegen für das Molekül charakteristische Schwingungen des gesamten Molekülgerüsts auftreten.<sup>[188–190]</sup> Ein gängiges Instrument zur Aufnahme von IR-Spektren ist ein Fourier-Transformations-IR-Spektrometer (FT-IR), in dem Infrarotstrahlung durch thermische Anregung eines *Nernst*-Stifts erzeugt und durch ein *Michelson*-Interferometer auf die Probe geleitet wird. Im *Michelson*-Interferometer wird die IR-Strahlung mit einem Strahlteiler auf einen arretierten und einen zweiten, über einen Mikrometerschlitten beweglichen Spiegel gelenkt. Nach Reflexion der Strahlung an den Spiegeln wird 50 % der gesamten Strahlung über den halbtransparenten Spiegel durch die Probe auf den Detektor gelenkt, der die Intensität der interferierenden Strahlung in Abhängigkeit vom Spiegelvorschub des beweglichen Spiegels misst. Die Interferogramme, welche die Strahlungsabsorption der Probe in Abhängigkeit von Wellenlänge und Intensität enthalten, werden mittels Fourier-Transformation in Transmissions- oder Absorptionsspektren umgerechnet. Eine spezielle Messtechnik stellt die ATR-Spektroskopie (Abgeschwächte Totalreflexion, *attenuated total reflexion*) dar. Der Analyt, in der ATR-Spektroskopie typischerweise stark absorbierende Feststoffe oder Flüssigkeiten, wird auf einen Kristall aus optisch sehr dichtem, für IR-Strahlung durchlässigen Material wie z.B. Diamant, IRTRAN-4 (ZnSe) oder KRS-5 (TlBr) aufgebracht und mit einem Stempel fest auf die Oberfläche des ATR-Kristalls gepresst. Trifft infrarote Strahlung in einem bestimmten Winkel durch den ATR-Kristall mit hohem Brechungsindex  $n_1$  auf die optisch weniger dichte Probe mit dem Brechungsindex  $n_2 \ll n_1$ , dringt die Strahlung zu einem Bruchteil der

Wellenlänge (0,5 - 5  $\mu\text{m}$ ) in die Probe ein und wird unter innerer Totalreflexion zurückgeworfen. Abgeschwächte Totalreflexion tritt dann auf, wenn eine Wechselwirkung des einfallenden Strahlenfeldes mit der Probe durch frequenzabhängige Absorptionsmechanismen stattfindet, durch welche die Intensität der totalreflektierten Strahlung in Abhängigkeit von der Frequenz verringert wird. Im Vergleich zu Transmissions-IR-Spektren sind die Banden im Bereich höherer Wellenzahlen in ATR-Spektren auf Grund der sehr kleinen Eindringtiefe von geringerer Intensität. Dieser Effekt führt gleichzeitig zu einer sehr hohen Oberflächensensitivität der ATR-Spektroskopie.<sup>[188,190,191]</sup>

### 6.1.2.3 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

FT-IR Spektren wurden mit einem Bruker Alpha-Platinum FTIR mit Probenaufnahme für abgeschwächte Totalreflexionsmessungen (ATR) aufgezeichnet. Die Probe wurde mit 24 Scans zwischen 4000 und 400  $\text{cm}^{-1}$  vermessen. Untersuchte Nanopartikeldispersionen wurden vor den Messungen mit einem Christ Alpha 2-4 LSC Gefriertrockner lyophilisiert.

### 6.1.2.4 NMR-Spektroskopie

#### 6.1.2.4.1 Theoretischer Hintergrund

Die NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) stellt eine der wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung von organischen und biologischen Molekülen dar. Atomkerne, die keine geradzahlige Massen- und Ordnungszahl aufweisen, besitzen durch ihren Eigendrehimpuls  $P$ , den Kernspin, ein zu  $P$  proportionales magnetisches Moment  $\mu$  (Gleichung 5).

$$\mu = \gamma P = \gamma \sqrt{l(l+1)} \frac{h}{2\pi} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$\mu$  : magnetisches Moment

$\gamma$  : gyromagnetisches Verhältnis

$P$  : Eigendrehimpuls

$l$  : Kernspinquantenzahl

$h$  : Planck'sches Wirkungsquantum

Da das magnetische Moment grundlegende Voraussetzung für Kernresonanzspektroskopie ist, sind nur Kerne mit einer Spinquantenzahl von  $l \neq 0$  NMR-aktiv, während Kerne mit einer Spinquantenzahl von  $l = 0$  nicht untersucht werden können. Der Kernspin kann in einem homogenen, statischen Magnetfeld der Stärke  $B_0$  unterschiedliche Orientierungen annehmen, die durch die magnetische Quantenzahl  $m = l, l-1, \dots, -l$  beschrieben werden. Diese insgesamt  $(2l+1)$  Orientierungen sind energetisch aufgespalten in die Kern-Zeeman-Niveaus (Gleichung 6).

$$E = \gamma m \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (\text{Gleichung 6})$$

$E$  : Energie des Zeeman-Niveaus

$m$  : magnetische Quantenzahl

$B_0$  : Magnetfeldstärke

Die Kerne führen im extern angelegten Magnetfeld auf Grund des magnetischen Moments und des Drehimpulses Präzessionsbewegungen aus, die mit der *Lamor*-Frequenz  $\nu_0$  beschrieben werden können. Diese ist an die Energiedifferenz der Zeeman-Niveaus gebunden und Bestandteil der Resonanzbedingung (Gleichung 7), die für eine Induktion von energetischen Übergängen zwischen den Energieniveaus erfüllt sein muss.

$$\Delta E = h\nu_0 = \frac{h}{2\pi} \gamma B_0 \quad (\text{Gleichung 7})$$

$\Delta E$  : Energiedifferenz zwischen den *Zeemann*-Niveaus

$\nu_0$  : *Lamor*-Frequenz

Ist die Resonanzbedingung erfüllt, so kommt es beim Bestrahlen von Atomen mit einem magnetischen Moment  $\mu \neq 0$  in einem angelegten Magnetfeld mit Stärken zwischen 2 und 15 Tesla durch Radiopulse zu Resonanz, das heißt zur Absorption von Energie für die Anregung auf ein höheres *Zeeman*-Niveau. Dabei hängt die energetische Aufspaltung der Niveaus und damit die zur Resonanz benötigte Frequenz der Strahlung vom Kern ab, da verschiedene Elemente und Isotopen unterschiedliche gyromagnetische Verhältnisse aufweisen. Da die den Kern und die Kerne von Nachbaratomen umgebenden Elektronen durch ihre Bewegung ein zusätzliches Magnetfeld induzieren, welches den Kern abschirmt, wird die Aufspaltung der Niveaus zusätzlich von der chemisch-strukturellen Umgebung des Kerns beeinflusst. Das effektive Magnetfeld am Kern unterscheidet sich vom extern angelegten Magnetfeld um das induzierte Feld  $B_0\sigma$  (Gleichung 8). Die Abschirmung des Kerns durch das induzierte Magnetfeld variiert in seiner Stärke mit chemisch nicht-äquivalenten benachbarten Kernen und führt zur charakteristischen Verschiebung der Resonanzfrequenzen.

$$B_{eff} = B_0 - B_0\sigma \quad (\text{Gleichung 8})$$

$B_{eff}$  : effektives Magnetfeld am Kern

$\sigma$  : Abschirmungskonstante

Die Wechselwirkung von sowohl homo- als auch heteronuklearen benachbarten Kernen, die das Magnetfeld der jeweiligen Nachbarkerne beeinflussen, führt zu einer Feinaufspaltung der Signale. Die chemische Verschiebung und Feinaufspaltung kann Hinweise auf bestimmte funktionelle Gruppen geben und zur Strukturaufklärung herangezogen werden.<sup>[188,189,192]</sup>

#### **6.1.2.4.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen**

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DPX 300 aufgenommen. Die Spektren wurden mit der Software TopSpin 3.0 der Firma Bruker ausgewertet.

#### **6.1.2.5 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)**

##### **6.1.2.5.1 Theoretischer Hintergrund**

Die Atomabsorptionsspektroskopie ist eine spektralanalytische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Elementen. Die physikalische Grundlage der Messmethode ist die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts durch den Analyten in der Gasphase, genauer dessen Resonanzabsorption. Wird in der Gasphase ein Lichtquant von einem Atom im angeregten Zustand emittiert, so kann dieses von einem anderen Atom des gleichen Elementes im Grundzustand aufgenommen werden. Jedes Element weist charakteristische Energien für die Anregung von Elektronensprüngen innerhalb der äußeren Elektronenhüllen auf. Wird ein Analyt in der Gasphase mit polychromatischem Licht bestrahlt, so resultiert durch Absorption von Licht bestimmter Wellenlängen ein eindeutiges Linienspektrum für jedes Element. Da Lampen, die ein kontinuierliches Spektrum aussenden, jedoch in den jeweiligen diskreten Wellenlängenbereichen nur sehr geringe Energie eintragen können, werden in der Atomabsorptionsspektroskopie Hohlkathodenlampen verwendet. Die Kathoden dieser Lampen sind aus dem jeweils zu untersuchenden Element gefertigt und erzeugen das Emissionsspektrum des betreffenden Elements in vergleichsweise hoher Intensität. Die Verwendung dieser elementspezifischen Hohlkathodenlampen führt zu einer hohen Selektivität der AAS. Für eine Messung wird die Probe atomisiert, z.B. durch thermische Zersetzung in einer Luft-Acetylen-Flamme oder elektrothermische Atomisierung in einem Graphitrohrföfen, und in der Gasphase mit Licht bestrahlt. Durch Absorptionen des Analyten wird der elektromagnetische Strahl geschwächt und diese Schwächung mit einem Detektor aufgezeichnet. Da die Anzahl der absorbierenden Teilchen direkt proportional zur Schwächung der Resonanzlinie ist, kann die Konzentration

des Analyten aus dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden (Gleichung 3).<sup>[191,193]</sup>

### **6.1.2.5.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen**

AAS-Messungen wurden von Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp im Labor für Mikroanalytik der Fakultät für Chemie an der Uni Essen nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005 mit einem Thermo Electron M-Series Spektrometer mit Graphitrohr durchgeführt. Der Analyt wurde vor der Messung mit Königswasser aufgeschlossen.

### **6.1.3 Weitere Methoden**

#### **6.1.3.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)**

##### **6.1.3.1.1 Theoretischer Hintergrund**

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) dient der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von dispersen Partikeln der Größenordnung Nano- bis Mikrometer und beruht auf der Analyse von Streulicht eines auf die Probe gerichteten Lasers. Trifft die elektromagnetische Strahlung auf das disperse System, so tritt *Rayleigh*-Streuung an den Partikeln auf. Da sich die Partikel auf Grund der *Brownschen* Molekularbewegung kontinuierlich in Bewegung befinden, ändern sich sowohl die Intensität als auch die Wellenlänge des gestreuten Laserlichts. Die Fluktuationen im Streulichtmuster, welche in Abhängigkeit von der Partikelgröße variieren, werden im Millisekundentakt gemessen und liefern die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel im fluiden Medium. Über die *Stokes-Einstein*-Beziehung (Gleichung 9) kann daraus die Größe der Partikel errechnet werden:



$$r = \frac{RT}{D6\pi\eta N_A} \quad (\text{Gleichung 9})$$

$r$  : Partikelradius

$R$  : allgemeine Gaskonstante

$T$  : Temperatur

$D$  : Diffusionskoeffizient

$\eta$  : Viskosität der flüssigen Phase

$N_A$  : Avogadro-Konstante

Die Fluktuation der detektierten Signale wird von der zugehörigen Software über eine Autokorrelationsfunktion ausgewertet und mittels Cumulantenmethode in den durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser (z-Average) der Partikel und die Breite der Größenverteilung (Polydispersitätsindex, PDI) umgerechnet. Es wird angenommen, dass ein PDI von  $\leq 0,3$  einer monodispersen Größenverteilung entspricht. Über unterschiedliche Algorithmen (NNLS, CONTIN) werden die Intensitätsverteilung, die Volumenverteilung und die statistische Größenverteilung (Number Statistics) der Partikel errechnet. Da die Intensitätsverteilung der Partikel unter Annahme von Rayleigh-Streuung berechnet wird, gilt die Abhängigkeit der Streulichtintensität  $I$  vom Partikeldurchmesser zur sechsten Potenz ( $d^6$ ).

$$I = \frac{I_0}{R^2} \frac{1+\cos^2\theta}{2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2 \left(\frac{d}{2}\right)^6 \quad (\text{Gleichung 10})$$

$I_0, I$  : Lichtintensität vor und nach Bestrahlen des Analyten

$R$  : Abstand zwischen Sphäre und Lichtquelle

$\theta$  : Streulichtwinkel

$n$  : Brechungsindex der Sphäre

$d$  : Durchmesser der Sphäre

Daher besteht die Gefahr, dass wenige große Partikel oder Agglomerate in der Probe das Streulicht kleiner Partikel überdecken und somit die Intensitätsverteilung stark in Richtung größerer Partikelradien verschieben.<sup>[24,194,195]</sup>

Das Zetapotential wird über die elektrophoretische Mobilität der Partikel, d.h. die Beweglichkeit von geladenen Partikeln in einer Dispersion relativ zum flüssigen Medium unter dem Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes, bestimmt. Wird an die Elektroden der Messküvette eine Spannung angelegt, so bewegen sich geladene Partikel in der Dispersion zu der Elektrode entgegengesetzter Ladung. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der induzierten Bewegung in Richtung Elektroden und der entgegengesetzt wirkenden Viskosität der Dispersion ein. Die resultierende Geschwindigkeit der Partikel wird gemessen, indem ein Laser auf die Messküvette gerichtet wird und das an den Partikeln gestreute Laserlicht unter einem festgelegten Winkel detektiert wird. Das resultierende Streumuster weist eine Fluktuation der Lichtintensität auf, deren Frequenz proportional zur Partikelgeschwindigkeit in der Dispersion ist. Durch einen Vergleich mit einem Referenzstrahl kann die elektrophoretische Mobilität bestimmt werden. Über die *Henry*-Gleichung (Gleichung 11) wird das Zetapotential errechnet:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$U_E$  : elektrophoretische Mobilität

$f(\kappa a)$  : *Henry*-Funktion

$\eta$  : Viskosität des flüssigen Mediums

$\zeta$  : Zetapotential

$\varepsilon$  : Dielektrizitätskonstante des flüssigen Mediums

Dabei enthält die *Henry*-Funktion  $f(\kappa a)$  Informationen über den Partikelradius ( $a$ ), sowie die reziproke Debye-Länge  $\kappa$  beziehungsweise die Dicke der elektrischen Doppelschicht  $\kappa^{-1}$  und gibt somit das Verhältnis zwischen der Dicke der Doppelschicht und dem Partikelradius an. Das Zetapotential wird in

den meisten Fällen in wässrigen Medien bei moderaten Elektrolytkonzentrationen von mehr als  $10^{-3}$  mol/L gemessen. Die *Henry*-Funktion  $f(\kappa a)$  wird in diesem Fall auf den Wert 1.5 gesetzt, was als *Smoluchowski*-Näherung bezeichnet wird. Für Partikel in Medien mit niedrigeren Dielektrizitätskonstanten als Wasser gilt die *Hückel*-Näherung, in der die *Henry*-Funktion auf den Wert 1,0 festgelegt ist.<sup>[195,196]</sup>

#### **6.1.3.1.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen**

Die Analysen erfolgten mit einem ZetasizerNano ZS ZEN 3600 (4 mW He-Ne Laser, 633 nm) der Firma Malvern. Die Proben wurden in Einweg-Zetaküvetten aus Polystyrol bei 25 °C unter 173° Rückstreuung gemessen. Weitere Messungen wurden mit einer Microtrac Nano-Flex 180° Rückstreuung DLS gemessen. Die Umrechnungen von Intensitätsverteilungen in Anzahlverteilungen wurden mit der Software DTS-Nano 5.0 der Firma Malvern vorgenommen.

#### **6.1.3.2 Differentielle zentrifugale Sedimentation (DCS)**

##### **6.1.3.2.1 Theoretische Grundlagen**

Die analytische Scheibenzentrifugation (*Differential centrifugal sedimentation* - DCS) ist eine hochauflösende Partikelgrößenmessmethode, die auf der Grundlage des *Stokesschen* Gesetzes eine unbekannte Partikelgrößenverteilung in einem definierten Zentrifugalfeld bestimmt, indem die Sedimentationsgeschwindigkeit der Nanopartikel in einer Flüssigkeit von bekannter Dichte und Viskosität gemessen wird. Das *Stokessche* Gesetz wird an den Zentrifugationsvorgang angepasst, um die variierenden g-Kräfte in Abhängigkeit vom Rotationsmittelpunkt zu berücksichtigen:

$$D = \sqrt{\frac{\left(18\eta \ln\left(\frac{R_f}{R_0}\right)\right)}{\left((\rho_p - \rho_f)\omega^2 t\right)}} \quad (\text{Gleichung 12})$$

$D$  : Partikeldurchmesser

$\eta$  : Viskosität der Flüssigkeit

$R_f$  : Äußere Radius der Rotation

$R_0$  : Innerer Radius der Rotation

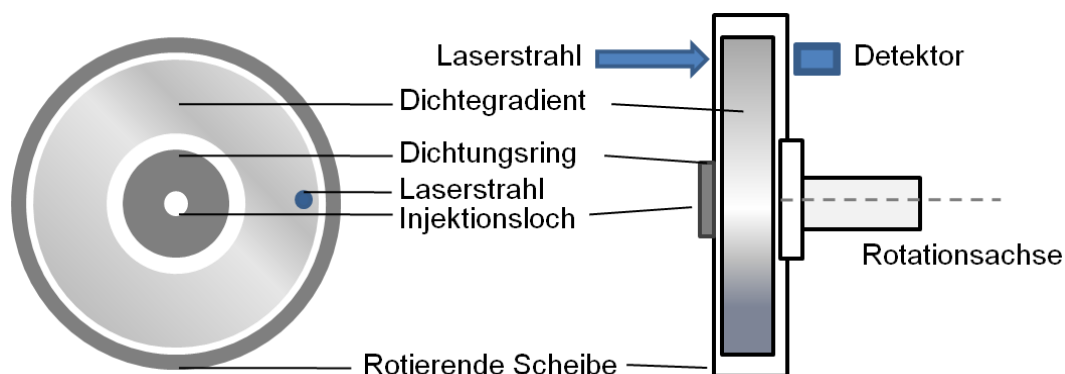
$\rho_p$  : Dichte des Partikelmaterials

$\rho_f$  : Dichte der umgebenden Flüssigkeit

$\omega$  : Winkelgeschwindigkeit

$t$  : Sedimentationszeit von  $R_0$  nach  $R_f$

Die hohle, mit definierter Geschwindigkeit rotierende Scheibe wird mit einem Dichtegradienten befüllt, um die Auflösung der Messung zu erhöhen. Vor jeder Messung wird ein Standard mit schmaler Größenverteilung gemessen, um die Zeitskala der Sedimentation auf den Partikeldurchmesser zu kalibrieren. Die in die Mitte der rotierenden Scheibe injizierten Partikel sedimentieren in Richtung des äußeren Scheibenrandes, wo sie von einem Laser detektiert werden.



**Abbildung 110: Schematischer Aufbau einer Scheibenzentrifuge in Aufsicht (links) und seitlicher Ansicht (rechts).**

Da die Sedimentationszeit proportional zum Quadrat des Partikeldurchmessers ist, hat die DCS eine sehr hohe Auflösung, die auch sehr kleine und/oder polydisperse Partikel mit ähnlicher Größe erfasst. Da die Scheibenzentrifuge die Partikelgröße an Hand einer zuvor zu definierenden Dichte ermittelt, bergen große Liganden wie etwa voluminöse Polymere die Gefahr die Partikelmessung zu verfälschen, da diese die effektive Dichte des einzelnen Nanopartikels absenken. Dies führt zu einer Unterschätzung der Partikelgröße.<sup>[197]</sup>

#### **6.1.3.2.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen**

Die DCS-Messungen wurden mit einer DC 24000 Scheibenzentrifuge von CPS Instruments bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 24000 upm (28978 g) durchgeführt. Die Wellenlänge des im Instrument verbauten Lasers ist 470 nm. Als Dichtegradient wurden zwei Saccharoselösungen (8 gew% und 24 gew%) verwendet. Der eingebrachte Gradient wurde mit Dodecan überschichtet, um ein Verdampfen des Wassers zu unterbinden. Vor jeder Messung wurde eine Kalibration mit einem Poly(vinylchlorid)latex-Standard in Wasser (CPS Instruments) mit einer Partikelgröße von 371 nm durchgeführt. Das Probenvolumen betrug in jeder Messung 100 µl.

#### **6.1.3.3 Röntgenpulverdiffraktometrie (PXRD)**

##### **6.1.3.3.1 Theoretischer Hintergrund**

Die Röntgenpulverdiffraktometrie (*powder X-ray diffraction* - PXRD) wird zur Charakterisierung von kristallographischen Parametern pulverisierter Feststoffe durch Beugung monochromatischer Röntgenstrahlung am Kristallgitter des Analyten genutzt. Da interatomare Abstände im Kristallgitter (ca. 100 - 300 pm) im Bereich der Wellenlänge der Röntgenstrahlung liegen (überlicherweise  $\lambda = 50 - 230$  pm), treten durch Beugung der Strahlung an Gitterpunkten mit hoher Elektronendichte Interferenzen in Form von abgelenkten Reflexen statt. Diese können vermessen werden und zur Aufklärung der Phasenzusammensetzung, der Kristallinität und im Idealfall auch der Kristallitgrößen und Gitterparameter herangezogen werden. Wird

ein dreidimensionales Kristallgitter mit Röntgenstrahlung bestrahlt, so gehen von den Streuzentren, den Elektronenhüllen der Gitteratome, welche den Maxima der Elektronendichteverteilung im Kristall entsprechen, durch elastische Streuung kugelsymmetrische Teilwellen aus. Diese Teilwellen können durch konstruktive Interferenz verstärkt oder durch destruktive Interferenz ausgelöscht werden. Eine geometrische Veranschaulichung der Bedingung für konstruktive Interferenz ist in (Abbildung 111) dargestellt. Der Gangunterschied  $\Delta$  der Sekundärwellen, die von den Streuzentren  $P_0$  und  $P_1$  ausgehen, entspricht:

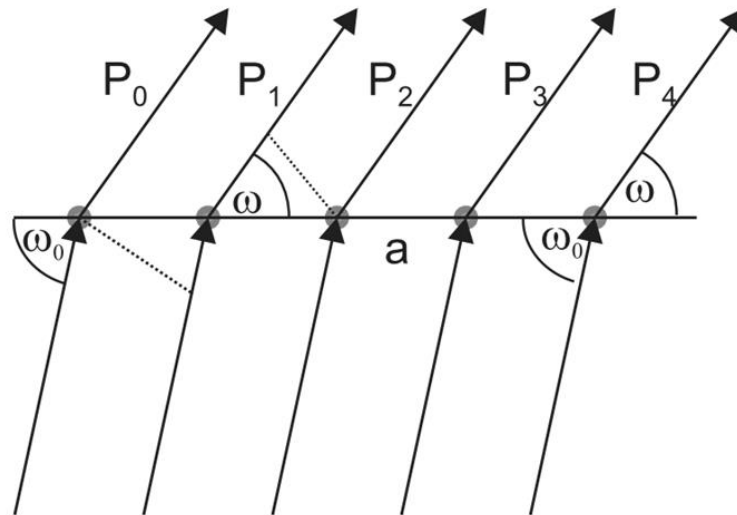
$$\Delta = a \cos \omega - a \cos \omega_0 = a_1 (\cos \omega - \cos \omega_0) \quad (\text{Gleichung 13})$$

Im Falle einer konstruktiven Interferenz muss dieser Gangunterschied einem ganzzahligen Vielfachen  $h$  der Wellenlänge  $\lambda$  entsprechen. Die Übertragung dieser Gleichung auf ein dreidimensionales Gitter, welches durch die sogenannten *Miller-Indices*  $hkl$  und die Translationsvektoren  $\vec{a}_1$ ,  $\vec{a}_2$ ,  $\vec{a}_3$  definiert ist, führt zu drei analogen Gleichungen, die für konstruktive Interferenz gleichzeitig erfüllt sein müssen:

$$a_1 (\cos \omega_1 - \cos \omega_{1,0}) = h\lambda \quad (\text{Gleichung 14})$$

$$a_1 (\cos \omega_2 - \cos \omega_{2,0}) = k\lambda$$

$$a_1 (\cos \omega_3 - \cos \omega_{3,0}) = l\lambda$$



**Abbildung 111: Geometrische Veranschaulichung von konstruktiver Interferenz an einer Punktkette.**<sup>[198]</sup>

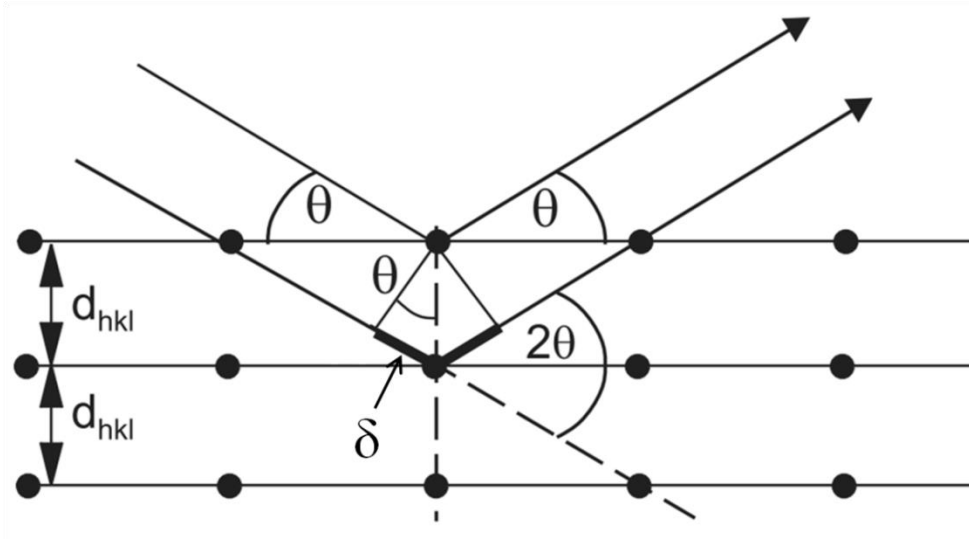
Werden die Streuvektoren  $\vec{s}_0$  (Einheitsvektor in Richtung des Primärstrahls) und  $\vec{s}$  (Einheitsvektor in Richtung der gestreuten Strahlung) eingesetzt, so ergeben sich die *Laue*-Bedingungen (Gleichung 15), welche das Auftreten von Beugungsreflexen durch elastische Streuung von Röntgenstrahlung an einem Kristallgitter beschreiben.

$$\vec{a}_1(\vec{s} - \vec{s}_0) = \vec{a}_1\vec{s} = h\lambda \quad (\text{Gleichung 15})$$

$$\vec{a}_2(\vec{s} - \vec{s}_0) = \vec{a}_2\vec{s} = k\lambda$$

$$\vec{a}_3(\vec{s} - \vec{s}_0) = \vec{a}_3\vec{s} = l\lambda$$

In einer weiteren geometrischen Veranschaulichung wird die Streuung von Röntgenstrahlung an zwei Netzebenen einer Kristallphase beschrieben, welche mit dem Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  parallel zur Kristalloberfläche liegen. Bedingung für eine konstruktive Interferenz von einfallender Röntgenstrahlung ist, dass die Streuwellen sich in gleicher Phase befinden. Wie in Abbildung 112 dargestellt, ist dies immer der Fall, wenn der Gangunterschied  $\delta$  der beiden Wellen ein ganzzahliges Vielfaches  $n$  der Wellenlänge  $\lambda$  beträgt.



**Abbildung 112: Geometrische Veranschaulichung von konstruktiver Interferenz an zwei Netzebenen.**<sup>[198]</sup>

Dies ist auf Grund der Winkelabhängigkeit von  $\delta$  nur für bestimmte Winkel  $\theta$  gegeben. Die Bedingung für konstruktive Interferenz im Falle einer Beugung an einer Netzebenschar ist der *Bragg*-Gleichung (Gleichung 16) ausgedrückt.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{Gleichung 16})$$

$n$  : Beugungsordnung

$\lambda$  : Wellenlänge

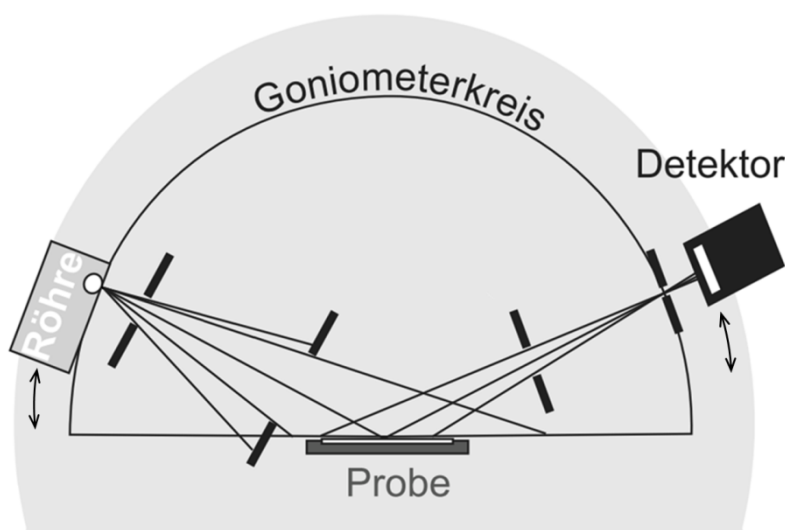
$d$  : Abstand der Netzebenen

$\theta$  : Beugungswinkel

Ein fein gemahlener polykristalliner Feststoff besteht aus vielen Kristalliten, kleinen Einkristallen mit willkürlicher Anordnung zur Oberfläche und Probenkante. Die Bestrahlung mit monochromatischem Röntgenlicht führt zu Beugung und konstruktiver Interferenz an den Kristallflächen, die durch ihre Orientierung die *Bragg*-Gleichung erfüllen. In einem Pulverdiffraktometer wird die Röntgenstrahlung, zumeist Cu-K $\alpha$ -Strahlung, in definiertem Winkel auf die Probe gestrahlt und von der Probe unter bestimmten Winkeln unter konstruktiver Interferenz gestreut. Ein Detektor, z.B. ein Szintillationszähler, nimmt die winkelabhängige Intensitätsverteilung, das für die jeweilige Kristallphase charakteristische Beugungsmuster, welches durch spezifische



Beugungsreflexlagen und Reflexintensitäten gekennzeichnet ist, auf. Ein gängiger Aufbau von Röntgenröhre und Detektor ist die sogenannte *Bragg-Brentano*-Anordnung (Abbildung 113), in der sich der Röntgenröhrenfokus und der Detektorfokus in einer konstanten Entfernung zur Probe befinden. Röntgenröhre und Detektor werden gleichzeitig mit definierter Winkelgeschwindigkeit auf einem *Theta-Theta*-Goniometerkreis aufeinander zu bewegt und die winkelabhängige Streuintensität gemessen.<sup>[198,199]</sup>



**Abbildung 113: Schematische Darstellung der *Bragg-Brentano*-Anordnung mit *Theta-Theta*-Goniometerkreis.**<sup>[198]</sup>

#### 6.1.3.3.2 Verwendetes Gerät und Spezifikationen

Die Pulverdiffraktogramme wurden mit einem Bruker D8 ADVANCE Röntgendiffraktometer über einen Bereich von 5 bis 90 °2 $\theta$  bei einer Schrittweite von 0.02 °2 $\theta$  in Reflexion aufgenommen. Das Gerät ist ausgestattet mit einer Cu-K $\alpha$ -Röntgenröhre ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) und LYNXEYE-Detektor. Die Proben wurden auf Probenträgern mit Glas- oder Siliciumuntergrund vermessen. Die Aufnahme der Röntgenpulverdiffraktogramme und die *Rietveld*-Verfeinerung wurden von Herrn Dr. Oleg Prymak am Institut für anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

## 6.2 Verwendete Chemikalien

Alle in der folgenden Auflistung angeführten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert erklärt, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

**Tabelle 23: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Angabe der Reinheit und des Herstellers.**

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
11-Mercaptoundecansäure	95 %	Aldrich
Ethanol	p.a.	Aldrich
Gerbsäure (Tannin, $C_{76}H_{52}O_{46}$ , $M = 1701,23 \text{ g mol}^{-1}$ )	95 %	Acros
Gold, elementar	99,99%	
Goldpulver, elementar	99,96+%	Alfa Aesar
Liponsäure	99%	Sigma
Natriumborhydrid	p.a.	Sigma
Trinatriumcitrat-Dihydrat	p.a.	AppliChem
Natriumhydroxid	p.a.	Fisher
Natriumtetraborat (Borax)	99%	Aldrich
Poly( <i>N</i> -vinylpyrrolidon) (PVP K30, $M = 40000 \text{ g mol}^{-1}$ )	p.a.	Sigma
Salpetersäure	p.a.	Fisher
Salzsäure 37%	p.a.	Aldrich
Silbernitrat	p.a.	Roth
Tri-(natrium- <i>meta</i> -sulfonatophenyl)- phosphan (TPPTS)	10% Oxid	Strem Chemicals

### 6.3 Synthesen

Vor den Synthesen wurden alle Glasgeräte mit frisch angesetztem Königswasser ausgekocht.

#### 6.3.1 Synthese durch Reduktion mit Citrat oder Citrat/Gerbsäure

##### 6.3.1.1 Au- und Ag-Nanopartikel

In einer Refluxapparatur aus Dreihalskolben, Rückflusskühler und Heizpilz oder Ölbad werden 50 mL Reinstwasser vorgelegt und zum Sieden erhitzt. Dann werden 500  $\mu$ L 10 mM Tetrachlorogoldsäure oder 500  $\mu$ L 10 mM Silbernitrat (5  $\mu$ mol) hinzugegeben.

Für eine Reduktion mit Citrat werden unter starkem Rühren 0,5 mL einer 77,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung (11,4 mg, 38,75  $\mu$ mol) mit einer Eppendorfpipette schnell zur Reaktionslösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 60 min refluxiert. Ein Farbumschlag von Grau über Blassrosa hin zu Kirschrot deutet auf das Fortschreiten der Reaktion hin. Nach 60 min wird der Kolben von der Heizquelle entfernt und in einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Für eine Reduktion mit Citrat und Gerbsäure wird unter starkem Rühren ein frisch angesetztes Gemisch aus 0,5 mL einer 77,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung (11,4 mg, 38,75  $\mu$ mol) und 1 mL einer 1,65 mM Gerbsäure-Lösung (2,8 mg, 1,65  $\mu$ mol) mit einer Eppendorfpipette schnell zur siedenden Reaktionslösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 10 min refluxiert. Ein beinahe sofortiger Farbumschlag nach Kirschrot zeigt den Fortgang der Reaktion an. Nach 10 min wird der Kolben von der Heizquelle entfernt und in einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

##### 6.3.1.2 Ag-Au-Nanopartikel

In einer Refluxapparatur aus Dreihalskolben, Rückflusskühler und Heizpilz oder Ölbad werden unter Lichtausschluss 50 mL entgastes Reinstwasser vorgelegt und zum Sieden erhitzt. Dann wird ein Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L 10 mM Metallsalzlösung hinzugegeben. Dabei werden für folgende molare Silber:Gold-Verhältnisse die in Tabelle 24 angegebenen Volumina verwendet:

**Tabelle 24: Volumina der Metallprecursorlösungen für unterschiedliche Ag: Au-Zusammensetzung in Ag-Au-Citrat/Tannin Nanopartikeln.**

<b>Molares Verhältnis</b>	<b>Volumen 10mM</b>	<b>Volumen 10mM</b>
<b>Ag: Au</b>	<b>Tetrachlorogoldsäure [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>Silbernitratlösung [<math>\mu\text{L}</math>]</b>
90:10	50	450
80:20	100	400
70:30	150	350
60:40	200	300
50:50	250	250
40:60	300	200
30:70	350	150
20:80	400	100
10:90	450	50

Für eine Reduktion mit Citrat werden unter starkem Rühren 0,5 mL einer 77,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung (11,4 mg, 38,75  $\mu\text{mol}$ ) mit einer Eppendorfpipette schnell zur Reaktionslösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 60 min refluxiert. Ein langsamer Farbumschlag in Abhängigkeit von den gewählten Metallpräkursorvolumina deutet auf das Fortschreiten der Reaktion hin. Nach 60 min wird der Kolben von der Heizquelle entfernt und in einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

Für eine Reduktion mit Citrat und Gerbsäure wird unter starkem Rühren ein frisch angesetztes Gemisch aus 0,5 mL 77,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung (11,4 mg, 38,75  $\mu\text{mol}$ ) und 1 mL 1,65 mM Gerbsäure-Lösung (2,8 mg, 1,65  $\mu\text{mol}$ ) mit einer Eppendorfpipette schnell zur siedenden Reaktionslösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 10 min refluxiert. Ein beinahe sofortiger Farbumschlag in Abhängigkeit von den gewählten Metallpräkursorvolumina zeigt den Fortgang der Reaktion an. Nach 10 min wird der Kolben von der Heizquelle entfernt und in einem Eisbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt.

### 6.3.1.3 Umfunktionalisierung der Nanopartikel

Eine Umfunktionalisierung der Nanopartikel mit verschiedenen Liganden wurde wie folgt durchgeführt:

Für eine Funktionalisierung mit Poly(*N*-vinylpyrrolidon) wird 1 mL einer 0,25 mM PVP-Lösung (10 mg, 0,25  $\mu\text{mol}$ ) zu der nicht weiter aufgereinigten Partikeldispersion gegeben. Das Gemisch wird für mindestens 2 h gerührt, dann werden die umfunktionalisierten Nanopartikel mittels Ultrazentrifugation (30.000 U min<sup>-1</sup>, 66.000 g, 30 min) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bodensatz wird mit einem Vortex in Reinstwasser redispergiert. Dieser Vorgang wird wiederholt.

Für eine Funktionalisierung mit Tri-(natrium-*meta*-sulfonatophenyl)-phosphan wird 1 mL einer 10,6 mM TPPTS-Lösung (6 mg, 10,6  $\mu\text{mol}$ ) zu der nicht weiter aufgereinigten Partikeldispersion gegeben. Das Gemisch wird für mindestens 2 h gerührt, dann werden die umfunktionalisierten Nanopartikel mittels Ultrazentrifugation (30.000 U min<sup>-1</sup>, 66.000 g, 30 min) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Bodensatz wird mit einem Vortex in Reinstwasser redispergiert. Dieser Vorgang wird wiederholt.

### 6.3.2 Synthese durch Reduktion mit Natriumborhydrid

Während der Synthesen aller im folgenden Abschnitt beschriebenen Metallnanopartikel wurde unter Sauerstoffausschluss gearbeitet. Dies wurde durch Synthese unter Argonatmosphäre und Entgasen des verwendeten Reinstwassers umgesetzt.

#### 6.3.2.1 Au-Nanopartikel

In einem 250 mL Stickstoffkolben werden 50 mL entgastes Reinstwasser vorgelegt und mit 500  $\mu\text{L}$  10 mM Tetrachlorogoldsäure oder Silbernitrat (5  $\mu\text{mol}$ ) versetzt. Dann wird 1 mL einer Lösung aus 25 mM 11-MUA oder LA und 50 mM NaOH hinzugegeben und für 10 min gerührt. Für die Reduktion werden 250  $\mu\text{L}$  einer frisch angesetzten 200 mM Lösung aus Natriumborhydrid (50  $\mu\text{mol}$ ) in Eiswasser mittels Eppendorfpipette unter starkem Rühren schnell zugegeben. Nach 10 min Rühren werden die Partikel durch Ansäuern der Dispersion mit 1 M HCl auf pH = 3 ausgefällt. Nach

Zentrifugation ( $3000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $1250 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$ ) wird der Überstand verworfen und die Partikel mit Hilfe eines Vortex in mit Reinstwasser redispergiert. Der Vorgang wird wiederholt. Im finalen Aufreinigungsschritt wird der Bodensatz in mit Borax/HCl-Puffer auf  $\text{pH} = 9$  eingestelltem Reinstwasser redispergiert.

### 6.3.2.2 Ag-Nanopartikel

In einem  $250 \text{ mL}$  Stickstoffkolben werden unter Lichtausschluss  $50 \text{ mL}$  entgastes Reinstwasser vorgelegt und mit  $500 \mu\text{L}$   $10 \text{ mM}$  Silbernitratlösung versetzt. Dann wird  $1 \text{ mL}$  einer Lösung aus  $25 \text{ mM}$  11-MUA oder LA und  $50 \text{ mM}$  NaOH hinzugegeben und für  $5 \text{ min}$  gerührt. Für die Reduktion werden  $250 \mu\text{L}$  einer frisch angesetzten  $200 \text{ mM}$  Lösung aus Natriumborhydrid ( $50 \mu\text{mol}$ ) in Eiswasser mittels Eppendorfpipette tropfenweise unter starkem Rühren zugegeben. Nach  $10 \text{ min}$  Rühren werden die Partikel durch Ansäuern der Dispersion mit  $1 \text{ M}$  HCl auf  $\text{pH} = 3$  ausgefällt. Nach Zentrifugation ( $3000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $1250 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$ ) wird der Überstand verworfen und die Partikel mit Hilfe eines Vortex in Reinstwasser redispergiert. Der Vorgang wird wiederholt. Im finalen Aufreinigungsschritt wird der Bodensatz in mit Borax/HCl-Puffer auf  $\text{pH} = 9$  eingestelltem Reinstwasser redispergiert.

### 6.3.2.3 Ag-Au-Nanopartikel

In einem  $250 \text{ mL}$  Stickstoffkolben werden unter Lichtausschluss  $50 \text{ mL}$  entgastes Reinstwasser vorgelegt und mit einem Gesamtvolumen von  $500 \mu\text{L}$   $10 \text{ mM}$  Metallsalzlösung versetzt. Die verwendeten molaren Au-Ag-Zusammensetzungen und die zugehörigen Volumina der Eduktlösungen entsprechen den in Tabelle 24 aufgeführten Werten. Dann wird  $1 \text{ mL}$  einer Lösung aus  $25 \text{ mM}$  11-MUA oder LA und  $50 \text{ mM}$  NaOH hinzugegeben und für  $10 \text{ min}$  gerührt. Für die werden  $250 \mu\text{L}$  einer frisch angesetzten  $200 \text{ mM}$  Lösung aus Natriumborhydrid ( $50 \mu\text{mol}$ ) in Eiswasser mittels Eppendorfpipette unter starkem Rühren schnell zugegeben. Nach  $10 \text{ min}$  Rühren werden die Partikel durch Ansäuern der Dispersion mit  $1 \text{ M}$  HCl auf  $\text{pH} = 3$  ausgefällt. Nach Zentrifugation ( $3000 \text{ U min}^{-1}$ ,  $1250 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$ ) wird der Überstand verworfen und die Partikel mit Hilfe eines Vortex in Reinstwasser redispergiert. Der Vorgang wird wiederholt. Im letzten Aufreinigungsschritt wird der Bodensatz in mit Borax/HCl-Puffer auf  $\text{pH} = 9$  eingestelltem Reinstwasser redispergiert. DHLA-stabilisierte Nanopartikel

werden alternativ zur Fällung mit Spinfiltern abzentrifugiert (Amicon, 4000 Da; 4000 U min<sup>-1</sup>, 60 min).

## **6.4 Zellbiologische Untersuchungen**

Die für die zellbiologischen Untersuchungen verwendeten Nanopartikel wurden jeweils frisch synthetisiert und in entgastem Reinstwasser unter Argonatmosphäre im Kühlschrank gelagert, um Oxidation und eine daraus folgende Freisetzung von Ag<sup>+</sup>-Ionen zu verhindern.<sup>[111,113,114]</sup>

### **6.4.1 Zytotoxizität von Ag:Au-50:50-PVP- und Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln und Freisetzung von IL-6 und IL-8**

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, Lonza, Walkersville Inc., MD, USA) werden in RPMI1640 mit 10% FCS und L-Glutamine (0.3 gL<sup>-1</sup>, GIBCO, Invitrogen GmbH) bei 37 °C in humider Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> in 24-well Zellkulturplatten kultiviert. Zum Passagieren werden adhärenente Zellen mit PBS-Lösung (PBS, GIBCO, Invitrogen GmbH) gewaschen und durch Zugabe von 0,2 mL 0.25% Trypsin / 0.05% Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) über 5 min bei 37 °C abgelöst. Danach wurden die hMSC gesammelt und zweifach mit RPMI1640/10% FCS gewaschen. Für Zytotoxizitätstests werden die hMSCs bei 37 °C in Gegenwart von Ag:Au-50:50-PVP- oder Ag:Au-50:50-TPPTS-Nanopartikeln für 24 h und 7 d unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Es werden 50 µL Nanopartikeldispersion entsprechend einer Gesamtmetallkonzentration von 5 µg mL<sup>-1</sup>, 10 µg mL<sup>-1</sup> und 20 µg mL<sup>-1</sup> bezogen auf Silber und/oder Gold vor der Kultivierung hinzugegeben.

Die Zellviabilität wird mittels Calcein-staining (Calcein-acetoxymethylester, calcein-AM, Calbiochem, Schwalbach, Germany) untersucht. Nach 24 h oder 7 d Kultivierung werden die Zellen zweifach mit RPMI1640 gewaschen und mit 1 µM Calcein-AM für 30 min bei 37 °C unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die adhärenenten Zellen werden erneut mit RPMI1640 gewaschen und mittels Fluoreszenzmikroskopie (Olympus MVX10) untersucht. Fluoreszenzmikrophotos wurden aufgenommen (Cell P, Olympus) und mit Adobe Photoshop® 7.0 digital verarbeitet. Lebende Zellen werden durch grüne Fluoreszenz gekennzeichnet. Die Freisetzung von IL-6 und IL-8 durch

hMSCs wurde in den Überständen mittels ELISA-Test nach einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt. Die Zellkulturexperimente wurden in der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Bergmannsheil in Bochum von Frau Dr. Christina Sengstock durchgeführt.

### 6.4.2 Zytotoxizität von 7 nm Ag:Ag-Au-PVP-Nanopartikeln

Die Zelltoxizitätsuntersuchungen von 6-7 nm legierten Silber-Gold-Nanopartikeln wurden mit HeLa-Zellen (humane transformierte Cervixepithelzellen) und hMSCs (humane mesenchymale Stammzellen) durchgeführt. Die HeLa-Zellen werden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Serum) mit Zusatz von 10% FCS (fötales Kälberserum), 100 U mL<sup>-1</sup> Penicillin und 100 U mL<sup>-1</sup> Streptomycin bei 37 °C in humider Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die hMSCs werden in RPMI 1640 (Roswell Memorial Park Institute Serum) mit Zusatz von 10 % FBS (fötales bovines Serum), 100 U mL<sup>-1</sup> Penicillin, 100 U mL<sup>-1</sup> Streptomycin, 2 mM L<sup>-1</sup> Glutamine und 10 mM HEPES-Puffer bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen werden etwa 12 h vor der Zugabe der Nanopartikel trypsinisiert und auf 24-Well Platten mit einer Zelldichte von 2,5 · 10<sup>4</sup> (HeLa) bzw. 2,0 · 10<sup>4</sup> (hMSCs) ausgesät. Pro Well werden 500 µL Partikeldispersion zugegeben. Die HeLa-Zellen werden mit 5, 50 und 100 µg Metall (Silber und/oder Gold) pro mL Dispersion inkubiert. Die Inkubation der hMSCs erfolgt mit Metallkonzentrationen von 5 µg mL<sup>-1</sup> und 50 µg mL<sup>-1</sup>. Zur Kontrolle werden jeweils Zellen ohne Zugabe von Nanopartikeln unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zytotoxizitätstests werden 5 h, 24 h und 72 h nach Inkubation mit reinen Goldnanopartikeln, reinen Silbernanopartikeln und legierten Silber-Gold-Nanopartikeln mit neun verschiedenen Zusammensetzungen (siehe Tabelle 24) unter Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Metallkonzentrationen der Stammdispersionen werden mittels AAS-Spektroskopie ermittelt.

Die Zellviabilität wird mittels MTT-Test ermittelt. Dazu wird MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in PBS (5 mg mL<sup>-1</sup>) gelöst und im Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> verdünnt. Das nach der Inkubation vorliegende Zellkulturmedium wird durch 300 µL der MTT-Lösung ersetzt, Nach 1 h wird die MTT-Lösung durch



300  $\mu\text{L}$  DMSO getauscht und die Zellkultur bei 37 °C unter 5%  $\text{CO}_2$  in humider Atmosphäre inkubiert. Nach 30 min wird ein 100  $\mu\text{L}$  Aliquot abgenommen und spektrophotometrisch mit einem Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) bei  $\lambda = 570 \text{ nm}$  untersucht. Zur Bestimmung der relativen Zellviabilität wird die Absorption auf die partikelfreien Kontrollen normiert. Die zellbiologischen Untersuchungen wurden von Frau Svitlana Chernousova am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

#### **6.4.2. Zytotoxizität von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln**

Die Zelltoxizitätsuntersuchungen von ultrakleinen Silber-Gold-Nanopartikeln wurden mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die HeLa-Zellen werden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Serum) mit Zusatz von 10% FCS (fötales Kälberserum), 100  $\text{U mL}^{-1}$  Penicillin und 100  $\text{U mL}^{-1}$  Streptomycin bei 37 °C in humider Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellen werden etwa 12 h vor der Zugabe der Nanopartikel trypsinisiert und auf 24-Well Platten mit einer Zelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  ausgesät. Pro Well werden 500  $\mu\text{L}$  Partikeldispersion zugegeben. Die HeLa-Zellen werden mit 5 und 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Metall (Silber und/oder Gold) pro mL Dispersion inkubiert. Zur Kontrolle werden jeweils Zellen ohne Zugabe von Nanopartikeln unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zytotoxizitätstests werden 24 h und 72 h nach Inkubation mit reinen Goldnanopartikeln, reinen Silbernanopartikeln und legierten Silber-Gold-Nanopartikeln mit neun verschiedenen Zusammensetzungen (siehe Tabelle 24) unter Zellkulturbedingungen durchgeführt. Die Metallkonzentrationen der Stammdispersionen werden mittels AAS-Spektroskopie ermittelt. Die Zellviabilität wird mittels MTT-Test ermittelt. Es wird analog zu der in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Die Zelltests wurden von Frau Diana Kozlova am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

### 6.4.3. Aufnahmestudie von ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln

Für Aufnahmestudien von ultrakleinen Silber-Gold-Nanopartikeln werden HeLa-Zellen in DMEM mit Zugabe von 10 % FCS, 100 U mL<sup>-1</sup> Penicillin, und 100 U mL<sup>-1</sup> Streptomycin bei 37 °C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. 12 h vor den Aufnahmestudien werden die Zellen trypsinisiert und mit einer Zelldichte von 1 · 10<sup>5</sup> Zellen in 0,5 mL Medium pro Well auf Zellkulturplatten ausgesät. Für die Aufnahmestudien werden die Zellen mit ultrakleinen Ag-Au-Nanopartikeln in unterschiedlichen Zusammensetzungen in serumfreiem Medium für 5 h und in Medium mit Zusatz von 10 % FCS für 5 h und 24 h inkubiert. Die verwendete Metallkonzentration der Dispersionen beträgt dabei jeweils 50 µg mL<sup>-1</sup>. Nach den angegebenen Zeiten werden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen um äußerlich anhaftende Nanopartikel zu entfernen und für 20 min bei Raumtemperatur mit 4 % wässriger Formalinlösung fixiert. Für eine Immunofluoreszenzfärbung werden die Zellen mit Alexa-488-konjugiertem Phalloidin inkubiert. Die Analyse der Zellen erfolgt mittels CLSM. Die Aufnahmestudie wurde von Frau Diana Kozlova am Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] *Nanoscience and nanotechnologies. Opportunities and uncertainties*, Royal Society; Royal Academy of Engineering, London, **2004**.
- [2] a) C. I. Aguirre, E. Reguera, A. Stein, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 2565–2578; b) G. I. N. Waterhouse, J. B. Metson, H. Idriss, D. Sun-Waterhouse, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1183–1190; c) K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small* **2005**, *1*, 180–192.
- [3] R. Bimczok, *Kosmetik. Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel ; 38 Tabellen*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [4] B. Nowack, H. F. Krug, M. Height, *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 1177–1183.
- [5] S. W. P. Wijnhoven, W. J. G. M. Peijnenburg, C. A. Herberts, W. I. Hagens, A. G. Oomen, E. H. W. Heugens, B. Roszek, J. Bisschops, I. Gosens, D. Van De Meent et al., *Nanotoxicology* **2009**, *3*, 109–138.
- [6] X. Chen, H.J. Schluesener, *Toxicol. Lett.* **2008**, *176*, 1–12.
- [7] R. Dastjerdi, M. Montazer, *Colloid. Surface B* **2010**, *79*, 5–18.
- [8] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 872–897.
- [9] a) M. Stobiecka, M. Hepel, *Biomaterials* **2011**, *32*, 3312–3321; b) A. Kolk, C. Haczek, C. Koch, S. Vogt, M. Kullmer, C. Pautke, H. Deppe, C. Plank, *Biomaterials* **2011**, *32*, 6850–6859; c) S. Guo, Y. Huang, Q. Jiang, Y. Sun, L. Deng, Z. Liang, Q. Du, J. Xing, Y. Zhao, P. C. Wang et al., *ACS Nano* **2010**, *4*, 5505–5511.
- [10] a) D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 2107–2114; b) M. J. Sailor, J.-H. Park, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 3779–3802; c) Y. Fukumori, H. Ichikawa, *Adv Powder Technol* **2006**, *17*, 1–28; d) D. Shenoy, S. Little, R. Langer, M. Amiji, *Mol. Pharmaceutics* **2005**, *2*, 357–366.
- [11] L. Hu, Z. Mao, C. Gao, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3108–3115.
- [12] a) C. Wu, W. Fan, M. Gelinsky, Y. Xiao, J. Chang, T. Friis, G. Cuniberti, *J. R. Soc. Interface* **2011**, *8*, 1804–1814; b) H. van Den Berghe, X. Garric, M. Vert, J. Coudane, *Polym. Int.* **2011**, *60*, 398–404.
- [13] W. J. Stark, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1242–1258.

- [14] a) N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2532–2542; b) L. Babes, B. Denizot, G. Tanguy, J. J. Le Jeune, P. Jallet, *J. Colloid Interf. Sci.* **1999**, 474–482; c) C. C. Berry, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, 42, 224003.
- [15] a) W. Busch, S. Bastian, U. Trahorsch, M. Iwe, D. Kühnel, T. Meißner, A. Springer, M. Gelinsky, V. Richter, C. Ikonomidou et al., *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 293–310; b) I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, 54, 631–651.
- [16] D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel, C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3280–3294.
- [17] R. A. Sperling, P. Rivera, F. Zhang, M. Zanella, W. J. Parak, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1896–1908.
- [18] a) C. A. J. Lin, C. H. Lee, J. T. Hsieh, H. H. Wang, J. K. Li, J. L. Shen, W. H. Chan, H. I. Yeh, W. H. Chang, *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, 29, 276–283; b) K. Yu, P. Ng, J. Ouyang, M. B. Zaman, A. Abulrob, T. N. Baral, D. Fatehi, Z. J. Jakubek, D. Kingston, X. Wu et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 2870–2880; c) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, 307, 538–544.
- [19] A. Leifert, Y. Pan-Bartnek, U. Simon, W. Jahn-Dechent, *Nanoscale* **2013**, 5, 6224.
- [20] L. Polavarapu, M. Manna, Q. H. Xu, *Nanoscale* **2011**, 3, 429–434.
- [21] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme. Physik und Chemie ; mit 88 Tabellen*, Springer, Berlin, **2002**.
- [22] I. Guareschi, *Zeitschr f Chem und Ind der Kolloide* **1911**, 8, 113–123.
- [23] M. Faraday, *Philos. T. R. Soc. Lond.* **1857**, 147, 145–181.
- [24] T. Cosgrove (Hrsg.) *Colloid Science. Principles, Methods and Applications*, Wiley, West Sussex, **2010**.
- [25] T. Hofmann, *Chem. Unserer Zeit* **2004**, 38, 24–35.
- [26] a) G. A. Mansoori (Hrsg.) *Principles of Nanotechnology: Molecular-Based Study of Condensed Matter in Small Systems*, World Scientific Pub Co Inc, Singapur, **2013**; b) N. L. Rosi, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1547–1562.

- [27] G. Schmid, *Nanoparticles. From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [28] J. H. Duffus, M. Nordberg, D. M. Templeton, *Pure Appl. Chem.* **2007**, 79, 1153–1344.
- [29] R. Hidalgo-Álvarez (Hrsg.) *Structure and functional properties of colloidal systems*, CRC Press, Boca Raton, **2000**.
- [30] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **1982**.
- [31] W. Sun, Q. Zeng, A. Yu, K. Kendall, *Langmuir* **2013**, 29, 7825–7837.
- [32] W. B. Russel, D. A. Saville, W. R. Schowalter, *Colloidal dispersions*, 1. Aufl., Cambridge Univ. Press, Cambridge, **2001**.
- [33] a) E. J. W. Verwey, *J. Phys. Colloid Chem.* **1947**, 631; b) B. Derjaguin, *Acta. Phys.-Chim.* **1939**, 333.
- [34] a) J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*, 3. Aufl., Academic Press, Burlington, MA, **2011**; b) R. J. Hunter, *Zeta Potential in colloid science: Principles and applications*, Academic Press, Burlington, MA, **1981**.
- [35] a) M. Cortada, J. A. Anta, J. A. Molina-Bolívar, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 1110–1118; b) V. Morales, J. A. Anta, S. Lago, *Langmuir* **2003**, 19, 475–482.
- [36] F. Caruso (Hrsg.) *Colloids and colloid assemblies*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
- [37] a) C. Lourenco, *Int. J. Pharm.* **1996**, 138, 1–12; b) J.-R. Roan, *Int. J. Mod. Phys. B* **2003**, 17, 2791–2820.
- [38] L. B. Hunt, *Gold Bull.* **1976**, 9, 134–139.
- [39] a) P. P. Edwards, J. M. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5480–5486; b) M. A. Hayat, *Colloidal gold: principles, methods, and applications*. 2, Academic Press, San Diego, **1989**.
- [40] M. Brust, C. J. Kiely, *Colloids Surf., A* **2002**, 175–186.
- [41] a) D. Xia, D. Li, Z. Ku, Y. Luo, Brueck, S. R. J., *Langmuir* **2007**, 23, 5377–5385; b) M. Urbánek, V. Uhlíř, P. Bábóř, E. Kolíbalová, T. Hrnčíř, J. Spousta, T. Šíkola, *Nanotechnology* **2010**, 21, 145304; c) H. Im, N. J. Wittenberg, N. C. Lindquist, S.-H. Oh, *J. Mater. Res.* **2012**, 27, 663–671.

- [42] S. Barcikowski, F. Mafuné, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 4985.
- [43] U. Taylor, S. Klein, S. Petersen, W. Kues, S. Barcikowski, D. Rath, *Cytometry* **2010**, *77*, 439–446.
- [44] C.-A. J. Lin, C.-H. Lee, J.-T. Hsieh, H.-H. Wang, J. K. Li, J.-L. Shen, W.-H. Chan, H.-I. Yeh, W. H. Chang, *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, *29*, 276–283.
- [45] L. Shang, S. Dong, G. U. Nienhaus, *Nano Today* **2011**, *6*, 401–418.
- [46] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C. J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall et al., *Langmuir* **1998**, *14*, 17–30.
- [47] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- [48] a) G. Frens, *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* **1972**, *250*, 736–741; b) G. Frens, *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22; c) J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- [49] M. A. Uppal, A. Kafizas, T. H. Lim, I. P. Parkin, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1401.
- [50] J. Polte, T. T. Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A. F. Thünemann, R. Kraehnert, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1296–1301.
- [51] X. Huang, H. Wu, X. Liao, B. Shi, *Green Chem.* **2010**, *12*, 395.
- [52] S. Mohapatra, R. K. Kumar, T. K. Maji, *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *508*, 76–79.
- [53] L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G. U. Nienhaus, *Small* **2011**, *7*, 2614–2620.
- [54] C. Leduc, S. Si, J. Gautier, M. Soto-Ribeiro, B. Wehrle-Haller, A. Gautreau, G. Giannone, L. Cognet, B. Lounis, *Nano Lett.* **2013**.
- [55] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Langmuir* **2001**, *17*, 6782–6786.
- [56] a) D. G. Duff, A. Baiker, P. P. Edwards, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 96; b) K. Vijaya Sarathy, G. U. Kulkarni, Rao, C. N. R., *Chem. Commun.* **1997**, 537–538.
- [57] S. D. Perrault, Chan, Warren C. W., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17042–17043.
- [58] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801.

- [59] M. Brust, C. J. Kiely, *Colloids Surf., A* **2002**, 202, 175–186.
- [60] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D. J. Schiffrin, C. Kiely, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1655.
- [61] M. J. Hostetler, S. J. Green, J. J. Stokes, R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 4212–4213.
- [62] a) X. M. Lin, C. M. Sorensen, K. J. Klabunde, *Chem. Mater.* **1999**, 11, 198–202; b) W. Hou, M. Dasog, R. W. J. Scott, *Langmuir* **2009**, 25, 12954–12961.
- [63] a) T. Biver, A. Corti, N. Eltugral, E. Lorenzini, M. Masini, A. Paolicchi, A. Pucci, G. Ruggeri, F. Secco, M. Venturini, *J. Nanopart. Res.* **2012**, 14; b) D. I. Gittins, F. Caruso, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40; c) B. L. V. Prasad, S. I. Stoeva, C. M. Sorensen, K. J. Klabunde, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 935–942.
- [64] a) F. Kim, S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, P. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3673–3677; b) D. Seo, J. C. Park, H. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14863–14870.
- [65] a) X. M. Lin, C. M. Sorensen, K. J. Klabunde, *J. Nanopart. Res.* **2000**, 2, 157–164; b) P. Sahu, B. Prasad, *Chem. Phys. Lett.* **2012**, 525–526, 101–104; c) B. L. V. Prasad, S. I. Stoeva, C. M. Sorensen, K. J. Klabunde, *Langmuir* **2002**, 18, 7515–7520.
- [66] X. Huang, S. Neretina, M. A. El-Sayed, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 4880–4910.
- [67] H.-Y. Wu, W.-L. Huang, M. H. Huang, *Cryst. Growth Des.* **2007**, 7, 831–835.
- [68] D. Gentili, G. Ori, M. Comes Franchini, *Chem. Commun.* **2009**, 5874.
- [69] J. E. Millstone, S. Park, K. L. Shuford, L. Qin, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5312–5313.
- [70] a) W. Niu, W. Zhang, S. Firdoz, X. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**; b) K. Sohn, F. Kim, K. C. Pradel, J. Wu, Y. Peng, F. Zhou, J. Huang, *ACS Nano* **2009**, 3, 2191–2198.
- [71] M. Giersig, P. Mulvaney, *Langmuir* **1993**, 9, 3408–3413.
- [72] a) A. Kassam, G. Bremner, B. Clark, G. Ulibarri, R. B. Lennox, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3476–3477; b) D. S. Sidhaye, B. L. V. Prasad, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 1680–1685; c) M. J. Hostetler, J. E. Wingate,

- C.-J. Zhong, J. Harris, N. D. Evans, R. W. Murray; d) A. Badia, W. Gao, S. Singh, L. Demers, L. Cuccia, L. Reven, *Langmuir* **1996**, *12*, 1262–1269.
- [73] a) A. Cruz Enriquez, I. A. Rivero Espejel, E. Andres García, M. E. Díaz-García, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 807–815; b) C.-W. Chang, S.-P. Chu, W.-L. Tseng, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7800–7806.
- [74] A. Chompoosor, G. Han, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1342–1345.
- [75] M. H. Stewart, K. Susumu, B. C. Mei, I. L. Medintz, J. B. Delehanty, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804–9813.
- [76] a) P. Joshi, S. Chakraborty, S. Dey, V. Shanker, Z. Ansari, S. P. Singh, P. Chakrabarti, *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, *355*, 402–409; b) D. Bartczak, A. G. Kanaras, *Langmuir* **2011**, *27*, 10119–10123; c) A. C. Templeton, M. J. Hostetler, E. K. Warmoth, Forbes, M. D. E., R. W. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 4845–4849; d) A. Riedinger, F. Zhang, F. Dommershausen, C. Röcker, S. Brandholt, G. U. Nienhaus, U. Koert, W. J. Parak, *Small* **2010**, *6*, 2590–2597.
- [77] D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Köller, M. Epple, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6176.
- [78] N. Khlebtsov, L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647.
- [79] a) W. P. McConnell, J. P. Novak, L. C. Brousseau, R. R. Fuierer, R. C. Tenent, D. L. Feldheim, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 8925–8930; b) P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1578–1586.
- [80] M. Homberger, U. Simon, *Philos. T. R. Soc. A* **2010**, *368*, 1405–1453.
- [81] N. Erathodiyil, J. Y. Ying, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 925–935.
- [82] D. M. Chevrier, A. Chatt, P. Zhang, *Journal of Nanophotonics* **2012**, *1*, 1–16.
- [83] F. X. Gu, R. Karnik, A. Z. Wang, F. Alexis, E. Levy-Nissenbaum, S. Hong, R. S. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Today* **2007**, *2*, 14–21.
- [84] H. Xu, K. S. Suslick, *ACS Nano* **2010**, *4*, 3209–3214.



- [85] a) D. Mitrakos, J. Jokiniemi, U. Backman, C. Housiadas, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 153–161; b) U. Backman, J. Jokiniemi, A. Auvinen, K. Lehtinen, *J. Nanopart. Res.* **2002**, *4*, 325–335.
- [86] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. García-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir* **2001**, *17*, 574–577.
- [87] P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391–3395.
- [88] X. Dong, X. Ji, H. Wu, L. Zhao, J. Li, W. Yang, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 6573–6576.
- [89] M. Takesue, T. Tomura, M. Yamada, K. Hata, S. Kuwamoto, T. Yonezawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14164–14167.
- [90] a) B. Sengupta, C. M. Ritchie, J. G. Buckman, K. R. Johnsen, P. M. Goodwin, J. T. Petty, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18776–18782; b) R. Desai, V. Mankad, S. K. Gupta, P. K. Jha, *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* **2012**, *4*, 30–34; c) N. Shirtcliffe, U. Nickel, S. Schneider, *J. Colloid Interf. Sci.* **1999**, *211*, 122–129.
- [91] L. Shang, R. M. Dörlich, V. Trouillet, M. Bruns, G. Ulrich Nienhaus, *Nano Res.* **2012**, *5*, 531–542.
- [92] a) T. Deckert-Gaudig, F. Erver, V. Deckert, *Langmuir* **2009**, *25*, 6032–6034; b) N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Chem. Commun.* **2001**, 617–618; c) Y. Han, J. Jiang, S. S. Lee, J. Y. Ying, *Langmuir* **2008**, *24*, 5842–5848; d) J. L. Li, X. Q. An, Y. Y. Zhu, *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*.
- [93] C. Chen, L. Wang, H. Yu, J. Wang, J. Zhou, Q. Tan, L. Deng, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 115612.
- [94] C.-X. Kan, J.-J. Zhu, X.-G. Zhu, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2008**, *41*, 155304.
- [95] B. J. Wiley, Z. Wang, J. Wei, Y. Yin, D. H. Cobden, Y. Xia, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2273–2278.
- [96] S. H. Im, Y. T. Lee, B. Wiley, Y. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2154–2157.
- [97] A. R. Siekkinen, J. M. McLellan, J. Chen, Y. Xia, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *432*, 491–496.
- [98] Y. He, X. Wu, G. Lu, G. Shi, *Mater. Chem. Phys.* **2006**, *98*, 178–182.
- [99] N. Murshid, V. Kitaev, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1247.

- [100] H. Wang, X. Qiao, J. Chen, S. Ding, *Colloids Surf., A* **2005**, 256, 111–115.
- [101] C. Chen, L. Wang, G. Jiang, J. Zhou, X. Chen, H. Yu, Q. Yang, *Nanotechnology* **2006**, 17, 3933.
- [102] a) G. A. Sotiriou, S. E. Pratsinis, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 5649–5654; b) J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang et al., *Nanomedicine* **2007**, 3, 95–101.
- [103] S. Chernousova, M. Eppele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1636–1653.
- [104] C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Eppele, M. Köller, *RSC Adv.* **2012**, 2, 6981.
- [105] C. Greulich, J. Diendorf, J. Geßmann, T. Simon, T. Habijan, G. Eggeler, T. A. Schildhauer, M. Eppele, M. Köller, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 3505–3514.
- [106] S. Kittler, C. Greulich, J. S. Gebauer, J. Diendorf, L. Treuel, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, R. Zellner, M. Köller et al., *J. Mater. Chem.* **2009**, 20, 512.
- [107] C. Greulich, J. Diendorf, T. Simon, G. Eggeler, M. Eppele, M. Köller, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 347–354.
- [108] P.-W. Li, T.-H. Kuo, J.-H. Chang, J.-M. Yeh, W.-H. Chan, *Toxicol. Lett.* **2010**, 197, 82–87.
- [109] A. Haase, J. Tentschert, H. Jungnickel, P. Graf, A. Manton, F. Draude, J. Plendl, M. E. Goetz, S. Galla, A. Mašić et al., *J. Phys.: Conf. Ser.* **2011**, 304, 12030.
- [110] R. D. Glover, J. M. Miller, J. E. Hutchison, *ACS Nano* **2011**, 5, 8950–8957.
- [111] S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Eppele, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 4548–4554.
- [112] a) M. Koch, S. Kiefer, C. Cavelius, A. Kraegeloh, *J. Nanopart. Res.* **2012**, 14; b) Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 4, 662–668.
- [113] J. Liu, R. H. Hurt, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 2169–2175.

- [114] J. Liu, D. A. Sonshine, S. Shervani, R. H. Hurt, *ACS Nano* **2010**, *4*, 6903–6913.
- [115] R. Vaidyanathan, K. Kalishwaralal, S. Gopalram, S. Gurunathan, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 924–937.
- [116] F. Calvo, *Nanoalloys. From fundamentals to emergent applications*, Elsevier, Waltham, USA, **2013**.
- [117] a) D. C. Lim, I. Lopez-Salido, R. Dietsche, Y. D. Kim, *Surf. Sci.* **2007**, *601*, 5635–5642; b) J.-H. Liu, A.-Q. Wang, Y.-S. Chi, H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 40–43; c) S. Tokonami, N. Morita, K. Takasaki, N. Toshima, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 10336–10341; d) A. F. Lee, C. J. Baddeley, C. Hardacre, R. M. Ormerod, R. M. Lambert, G. Schmid, H. West, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 6096–6102; e) S. Song, R. Liu, Y. Zhang, J. Feng, D. Liu, Y. Xing, F. Zhao, H. Zhang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6251–6256.
- [118] S. Devarajan, P. Bera, S. Sampath, *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *290*, 117–129.
- [119] a) M. Moskovits, I. Srnová-Šloufová, B. Vlčková, *J. Chem. Phys.* **202**, *116*, 10435–10446; b) G. C. Papavassiliou, *J. Phys. F. Metal Phys.* **1976**, *6*; c) G. R. Yashan, A. M. Eremenko, N. P. Smirnova, *Theor. Exp. Chem.* **2008**, *44*; d) D. Barreca, A. Gasparotto, C. Maragno, E. Tondello, S. Gialanella, *J. Nanosci. Nanotech.* **2007**, *7*, 2480–2486.
- [120] F. Hubenthal, N. Borg, F. Träger, *Appl. Phys. B* **2008**, *93*, 39–45.
- [121] S. Link, Z. L. Wang, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3529–3533.
- [122] a) I. Robinson, L. D. Tung, S. Maenosono, C. Wälti, N. T. K. Thanh, *Nanoscale* **2010**, *2*, 2624; b) A. D. Lehmann, W. J. Parak, F. Zhang, Z. Ali, C. Röcker, G. U. Nienhaus, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, *Small* **2010**, *6*, 753–762.
- [123] V. A. Lubarda, *Mech. Mater.* **2003**, *35*, 53–68.
- [124] a) I. Srnová-Šloufová, F. Lednický, A. Gemperle, J. Gemperlová, *Langmuir* **2000**, *16*, 9928–9935; b) M. P. Mallin, C. J. Murphy, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1235–1237; c) F. Douglas, R. Yañez, J. Ros, S. Marín, A. Escosura-Muñiz, S. Alegret, A. Merkoçi, *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*,

- 97–106; d) D. Mott, Thuy, N. T. B., Y. Aoki, S. Maenosono, *Philos. T. R. Soc. A* **2010**, 368, 4275–4292.
- [125] D. Mahl, J. Diendorf, S. Ristig, C. Greulich, Z.-A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, *J. Nanopart. Res.* **2012**, 14, 1153.
- [126] I. Srnová-Šloufová, B. Vlčková, Z. Bastl, T. L. Hasslett, *Langmuir* **2004**, 20, 3407–3415.
- [127] W. Xie, Le Su, P. Donfack, A. Shen, X. Zhou, M. Sackmann, A. Materny, J. Hu, *Chem. Commun.* **2009**, 5263.
- [128] H. M. Chen, R. Liu, L.-Y. Jang, J.-F. Lee, S. F. Hu, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 421, 118–123.
- [129] A. Pal, S. Shah, V. Kulkarni, R. Murthy, S. Devi, *Mater. Chem. Phys.* **2009**, 113, 276–282.
- [130] P. Raveendran, J. Fu, S. L. Wallen, *Green Chem.* **2006**, 8, 34.
- [131] D.-H. Chen, C.-J. Chen, *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 1557–1562.
- [132] F. J. Ibañez, F. P. Zamborini, *ACS Nano* **2008**, 2, 1543–1552.
- [133] C. M. Gonzalez, Y. Liu, J. C. Scaiano, *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 11861–11867.
- [134] S. Grade, J. Eberhard, J. Jakobi, A. Winkel, M. Stiesch, S. Barcikowski, *Gold Bull.* **2013**.
- [135] a) D. Radziuk, D. Shchukin, H. Mohwald, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 2462–2468; b) D. V. Radziuk, W. Zhang, D. Shchukin, H. Möhwald, *Small* **2010**, 6, 545–553.
- [136] X. Le Guével, V. Trouillet, C. Spies, K. Li, T. Laaksonen, D. Auerbach, G. Jung, M. Schneider, *Nanoscale* **2012**, 4, 7624.
- [137] C.-C. Huang, H.-Y. Liao, Y.-C. Shiang, Z.-H. Lin, Z. Yang, H.-T. Chang, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 755.
- [138] C. Kumara, A. Dass, *Nanoscale* **2011**, 3, 3064–3067.
- [139] T. Udayabhaskararao, Y. Sun, N. Goswami, S. K. Pal, K. Balasubramanian, T. Pradeep, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2155–2159.
- [140] T. Li, B. Albee, M. Alemayehu, R. Diaz, L. Ingham, S. Kamal, M. Rodriguez, S. Whaley Bishnoi, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 689–700.

- [141] D. Tiedemann, U. Taylor, C. Rehbock, J. Jakobi, S. Klein, W. A. Kues, S. Barcikowski, D. Rath, *Analyst* **2014**.
- [142] K. A. Willets, Van Duyne, Richard P, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 267–297.
- [143] Eleonora Petryayeva, Ulrich J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **2011**, 706, 8–24.
- [144] P. Mulvaney, *Langmuir* **1996**, 788–800.
- [145] N. J. Mol, M. J. E. Fischer (Hrsg.) *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, **2010**.
- [146] M. M. Alvarez, J. T. Khoury, T. G. Schaaff, M. N. Shafigullin, I. Vezmar, R. L. Whetten, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 3706–3712.
- [147] S. Chen, *Science* **1998**, 280, 2098–2101.
- [148] L. Shang, G. U. Nienhaus, *Mater. Today* **2013**, 16, 58–66.
- [149] Y.-C. Shiang, C.-C. Huang, W.-Y. Chen, P.-C. Chen, H.-T. Chang, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 12972.
- [150] I. Sakanaga, M. Inada, T. Saitoh, H. Kawasaki, Y. Iwasaki, T. Yamada, I. Umezu, A. Sugimura, *Appl. Phys. Express* **2011**, 4, 95001.
- [151] Z. Zhang, L. Xu, H. Li, J. Kong, *RSC Adv.* **2012**, 3, 59.
- [152] C.-C. Huang, Z. Yang, K.-H. Lee, H.-T. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6824–6828.
- [153] Z. Wu, R. Jin, *Nano Lett.* **2010**, 10, 2568–2573.
- [154] X. Le Guével, B. Hötzer, G. Jung, K. Hollemeyer, V. Trouillet, M. Schneider, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 10955–10963.
- [155] A. Rostek, D. Mahl, M. Eppele, *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 4809–4814.
- [156] D. Mahl, J. Diendorf, W. Meyer-Zaika, M. Eppele, *Colloids Surf., A* **2011**, 377, 386–392.
- [157] N. C. Bell, C. Minelli, J. Tompkins, M. M. Stevens, A. G. Shard, *Langmuir* **2012**, 28, 10860–10872.
- [158] a) M. Schlüter, *Z. Physik* **1972**, 87–98; b) J. Sinzig, U. Radtke, M. Quinten, U. Kreibig, *Z. Phys. D.* **1993**, 242–245; c) J. Yang, J. Y. Lee, H.-P. Too, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 19208–19212; d) K.-S. Lee, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 19220–19225.
- [159] Z. Krpetić, A. M. Davidson, M. Volk, R. Lévy, M. Brust, D. L. Cooper, *ACS Nano* **2013**, 7, 8881–8890.

- [160] S. K. Ghosh, S. Nath, S. Kundu, K. Esumi, T. Pal, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13963–13971.
- [161] a) I. Tunc, H. Osman Guvenc, H. Sezen, S. Suzer, M. A. Correa-Duarte, L. M. Liz-Marzán, *J. Nanosci. Nanotech.* **2008**, *8*, 3003–3007;  
b) H. T. Beyene, V. S. K. Chakravadhanula, C. Hanisch, M. Elbahri, T. Strunskus, V. Zaporojtchenko, L. Kienle, F. Faupel, *J. Mater. Sci.* **2010**, *45*, 5865–5871.
- [162] Q. Zhang, J. Y. Lee, J. Yang, C. Boothroyd, J. Zhang, *Nanotechnology* **2007**, *18*, 245605.
- [163] a) Y. Rosenberg, V. S. Machavariani, A. Voronel, S. Garber, A. Rubshtein, A. I. Frenkel, E. A. Stern, *J. Phys.: Condens. Matter* **2000**, *12*, 8081–8088; b) S. V. Nagender Naidu, C. R. Houska, *J. Appl. Phys.* **1971**, *42*, 4971.
- [164] V. Petkov, S. Shastri, S. Shan, P. Joseph, J. Luo, C.-J. Zhong, T. Nakamura, Y. Herbani, S. Sato, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 22131–22141.
- [165] L. Pauling, *P. Natl. A. Sci.* **1987**, *84*, 4754–4756.
- [166] Q. Zhang, J. Xie, J. Liang, J. Y. Lee, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 1387–1398.
- [167] M. P. Monopoli, D. Walczyk, A. Campbell, G. Elia, I. Lynch, F. Baldelli Bombelli, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2525–2534.
- [168] a) A. Liang, N. Zhang, Z. Jiang, R. Liu, *Sci. China Ser. B-Chem.* **2008**, *51*, 226–232; b) H. J. Johnston, G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin, V. Stone, *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 328–346.
- [169] Y. Guo, Z. Wang, H. Shao, X. Jiang, *Analyst* **2011**, *137*, 301.
- [170] J. Sun, J. Zhang, Y. Jin, *J. Mater. Chem. C* **2012**, *1*, 138.
- [171] J. F. Smalley, K. Chalfant, S. W. Feldberg, T. M. Nahir, E. F. Bowden, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1676–1685.
- [172] T.-y. Zhou, L.-p. Lin, M.-c. Rong, Y.-q. Jiang, X. Chen, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9839–9844.
- [173] Y.-A. Lee, R. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7778–7779.
- [174] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3. Aufl., Springer, New York, **2010**.

- [175] M. Cargnello, N. L. Wieder, P. Canton, T. Montini, G. Giambastiani, A. Benedetti, R. J. Gorte, P. Fornasiero, *Chem. Mater.* **2011**, 23, 3961–3969.
- [176] E. Reyes, R. Madueño, M. Blázquez, T. Pineda, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 15955–15962.
- [177] K. S. Birdi, *Self-assembly monolayer structures of lipids and macromolecules at interfaces*, Springer US, Boston, MA, **2002**.
- [178] a) L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, 43, 437–463; b) R. G. Snyder, M. Maroncelli, H. L. Strauss, C. A. Elliger, D. G. Cameron, H. L. Casal, H. H. Mantsch, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 133–134.
- [179] a) J. S. Seo, D. M. Son, H. Lee, J. Kim, Y. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, 2651–2654; b) R. H. Terrill, T. A. Postlethwaite, C.-h. Chen, C.-D. Poon, A. Terzis, A. Chen, J. E. Hutchison, M. R. Clark, G. Wignall, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12537–12548.
- [180] G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka, A. V. Ufimtsev, *Russ. Chem. B. Int. Ed.* **2003**, 52.
- [181] A. G. Young, D. P. Green, A. J. McQuillan, *Langmuir* **2007**, 23, 12923–12931.
- [182] a) Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon, W. Jahnen-Dechent, *Small* **2009**, 5, 2067–2076; b) Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, W. Jahnen-Dechent, *Small* **2007**, 3, 1941–1949.
- [183] a) L. Yang, L. Shang, G. U. Nienhaus, *Nanoscale* **2013**, 5, 1537–1543; b) X. Jiang, C. Rücker, M. Hafner, S. Brandholt, R. M. Dörlich, G. U. Nienhaus, *ACS Nano* **2010**, 4, 6787–6797.
- [184] R. F. Egerton, *Physical principles of electron microscopy. An introduction to TEM, SEM and AEM*, Springer Science and Business Media, New York, **2005**.
- [185] P. D. Nellist, S. J. Pennycook, *Adv. Imag. Elect. Phys.* **2000**, 113, 147–203.
- [186] a) Q. Wu, F. A. Merchant, K. R. Castleman, *Microscope image processing*, Elsevier, Amsterdam [etc.], **2008**; b) S. W. Paddock (Hrsg.)

- Methods and protocols*, Vol. 1075, Humana Press Springer, New York, NY, Heidelberg [u.a.], **2014**.
- [187] F. G. Wouterlood (Hrsg.) *Cellular imaging techniques for neuroscience and beyond*, Elsevier/Academic Press, Amsterdam, **2012**.
- [188] J. B. Lambert, S. Gronert, H. F. Shurvell, D. A. Lightner, *Spektroskopie*, 2. Aufl., Pearson Deutschland GmbH, München, **2012**.
- [189] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2012**.
- [190] H. Günzler, H. U. Gremlich, *IR-Spektroskopie. Eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [191] G. Schwedt, *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [192] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 5. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [193] M. Otto, *Analytische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [194] B. J. Berne, R. Pecora, *Dynamic light scattering. With applications to chemistry, biology, and physics*, Dover Publications, Mineola, New York, **2000**.
- [195] Malvern Instruments, *Instruction Manual*.
- [196] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, J. Lyklema, *Pure Appl. Chem.* **2005**, 77, 1753–1805.
- [197] J. Scott, S. E. Harding, A. (.) Rowe, *Analytical Ultracentrifugation*, RSC Publishing, Cambridge, **2005**.
- [198] L. Spieß, G. Teichert, R. Schwarzer, H. Behnken, C. Genzel, *Moderne Röntgenbeugung. Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker*, 3. Aufl., Vieweg & Teubner, Wiesbaden, **2013**.
- [199] a) W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, 5. Aufl., Teubner, Wiesbaden, **2007**; b) L. Smart, E. Moore, *Einführung in die Festkörperchemie*, Vieweg, Wiesbaden, **1997**.



## 8. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

11-MUA:	11-Mercaptoundecansäure
AAS:	Atomabsorptionsspektroskopie
AOT:	Natriumdioctylsulfosuccinat
ATR:	Abgeschwächte Totalreflexion
CLSM:	Konfokale Laserscanningmikroskopie
DAPI:	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCS:	Differentielle Zentrifugale Sedimentation, Scheibenzentrifuge
DHLA:	Dehydroliponsäure
DLS:	Dynamische Lichtstreuung
DLVO:	DLVO-Theorie nach <i>Derjaguin, Landau, Verwey</i> und <i>Overbeek</i>
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Zellmedium)
EDX:	Energiedispersive Röntgenabsorptionsspektroskopie
FCS:	Fötales Kälberserum
FT:	Fourier-Transformation
HAADF:	Weitwinkliger annularer Dunkelfelddetektor
HGF:	humane Gingivafibroblasten
HeLa:	<i>meint hier:</i> Transformierte humane Cervixepithelzellen
hMSC:	Humane mesenchymale Stammzellen
HOMO:	Höchstes besetztes Molekülorbital
IL:	Interleukin
IR:	Infrarot

LA:	Liponsäure
LSPR:	Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz
LUMO:	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
MRT:	Magnetresonanztomographie
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR:	Kernresonanzspektroskopie
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDI:	Polydispersitätsindex
PDF:	(Atom)Paarverteilungsfunktion
PEG:	Polyethylenglykol
PVP:	Poly( <i>N</i> -vinylpyrrolidon)
REM:	Rasterelektronenmikroskopie
RPMI:	Roswell Memorial Park Institute (Zellmedium)
SAXS:	Röntgenkleinwinkelstreuung
SCG:	Doppelschichtmodell nach <i>Stern</i> , <i>Gouy</i> und <i>Chapman</i>
STEM:	Rastertransmissionselektronenmikroskopie
TEM:	Transmissionselektronenmikroskopie
THPC:	<i>Tetrakis</i> (hydroxymethyl)-phosphoniumchlorid
TPPTS:	Tri-(natrium- <i>m</i> -sulfatophenyl)-phosphan
UV:	Ultraviolett
XANES:	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie
XRD:	Röntgenbeugung

## Publikationsliste

### Publikationen in wissenschaftlich referierten Fachzeitschriften

- D. Mahl, J. Diendorf, S. Ristig, C. Greulich, Zi-An Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, "Silver, gold, and alloyed silver-gold nanoparticles: characterization and comparative cell-biologic action", *Journal of Nanoparticle Research*, **2012**, 14, 1153.
- O. Prymak, S. Ristig, W. Meyer-Zaika, A. Rostek, L. Ruiz, J.M. Gonzalez-Calbet, M. Vallet-Regi, M. Eppe, "X-ray powder diffraction as a tool to investigate the ultrastructure of nanoparticles", *Izvestiya Vuzov, Fizika* (in Russian), **2013**, 10, pp. 5-9; cover-to-cover translation: *Russian Physics Journal*, **2014**, 56, 1111.
- H. Fissan, S. Ristig, H. Kaminski, C. Asbach, M. Eppe, "Characterization of nanoparticles in dispersions by using aerosol sizing measurement techniques", *Analytical Methods*, **2014**, 6, 7324.
- S. Ristig, D. Kozlova, W. Meyer-Zaika, M. Eppe, "An easy synthesis of autofluorescent alloyed silver-gold nanoparticles", *Journal of Materials Chemistry B*, **2014**, 2, 7887.

### Sonstige Publikationen

- J. Diendorf, D. Mahl, S. Ristig, C. Greulich, Z.A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, "Synthese von kleinen Silber-, Gold- und Silber-Gold(50:50)-Nanopartikeln in Wasser mittels Citrat-Reduktion in Anwesenheit von Gerbsäure: Charakterisierung und zellbiologische Aktivität", *Biomaterialien*, **2011**, 12, 46.
- A. Rostek, J. Diendorf, S. Ristig, M. Eppe, C. Greulich, M. Köller, "Silber-, Gold- und Silber-Gold-Nanopartikel: Vergleichende zellbiologische Untersuchungen", *BioNanoMaterials*, **2012**, 13, 213.

### **Wissenschaftliche Posterbeiträge auf Fachtagungen**

- International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles, Essen, 11.-15.09.2011, D. Mahl, J. Diendorf, S. Ristig, C. Greulich, Zi-An Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, "Nanoparticles of silver, gold, and silver-gold (50:50) prepared in water by citrate reduction in the presence of tannin: Characterization and biological properties"
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Gießen, 10.-12.11.2011, J. Diendorf, D. Mahl, S. Ristig, C. Greulich, Z.A. Li, M. Farle, M. Köller, M. Eppe, "Synthese von kleinen Silber-, Gold- und Silber-Gold(50:50)-Nanopartikeln in Wasser mittels Citrat-Reduktion in Anwesenheit von Gerbsäure: Charakterisierung und zellbiologische Aktivität"
- 9th International Conference and Workshop on Biological Barriers – in vitro and in silico Tools for Drug Delivery and Nanosafety Research, Saarbrücken, 29.02.-09.03.2012, B.D. Johnston, M. Schäffler, C. Pfeiffer, S. Ristig, P. Mayer, D. Aldiguez, N. Senger, S. Kaidel, A. Wenk, S. Hirn, S. Thalhammer, S. Hauck, H. Sarioglu, P. Rivera Gil, J.M. Montenegro Martos, M. Eppe, W. Parak, W. Kreyling, "Protein corona formation on 5 nm Au NPs with differential ligand configuration following exposure to mouse serum or BAL",
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg, 01.-03.11.2012, A. Rostek, J. Diendorf, S. Ristig, M. Eppe, C. Greulich, M. Köller, "Silber-, Gold- und Silber-Gold-Nanopartikel: Vergleichende zellbiologische Untersuchungen"
- MRS Fall Meeting, Boston, USA, 25.-30.11.2012, S. Ristig, J. Diendorf, D. Mahl, C. Greulich, Z.A. Li, M. Farle, M. Koeller, M. Eppe, "Alloyed silver-gold nanoparticles and their effect on human mesenchymal stem cells: between silver and gold"

- SPIE Photonics, San Francisco, USA, 02.-07.02.2013, B.D. Johnston, M. Clift, M. Schäffler, C. Pfeiffer, S. Ristig, S. Hauck, H. Sarioglu, P. Rivera Gil, J.M. Montenegro Martos, M. Eppe, A. Fink, W. Parak, P. Wick, W. Kreyling, B. Rothen-Rutishauser, "Effect of surface modification on protein corona formation and uptake of 5 nm Au NPs"
- 25th European Symposium on Biomaterials (ESB 2013), 08.-12.09.2013, Madrid, S. Ristig, S. Chernousova, J. Diendorf, D. Mahl, C. Greulich, M. Koeller, M. Eppe, "Alloyed silver-gold nanoparticles and their effect on cell viability"

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

***„Bimetallische Silber-Gold-Nanopartikel - Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Untersuchungen“***

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen, im Juli 2014

Simon Ristig

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht einsehbar.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, mich beim Anfertigen unterstützt haben und mit denen ich eine großartige Zeit verbringen konnte.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Epple für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, für den gewährten Freiraum in der Forschung, die stetige Unterstützung und die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes in New York sowie der Besuche zahlreicher Tagungen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Stephan Barcikowski danke ich für die Übernahme des Korreferats und die interessante Sichtweise auf die Nanopartikelforschung.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Heinz Fissan, Herrn Dr. Heinz Kaminski, Herrn Prof. Dr. Manfred Köller und Frau Dr. Christina Sengstock danke ich für die ergebnisreiche und angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Oleg Prymak und Herrn Dipl.-Ing. Jürgen Gündel-Graber danke ich für die Einarbeitung in die Röntgenpulverdiffraktometrie und die Erstellung zahlreicher Messungen.

Frau Carola Fischer danke ich, dass sie bei allen technischen, aber eigentlich auch allen anderen Fragen und Aufgaben ansprechbar war und mit großer Hilfsbereitschaft zahlreiche kleine Probleme gelöst hat.

Frau Ursula Giebel danke ich für die Hilfestellung bei NMR-Messungen und die Nachsicht beim Bezahlen der Kaffeeschulden.

Frau Veronika Hiltenkamp und Frau Kerstin Brauner danke ich für die zahllosen AAS-Messungen.

Herrn Dr. Wolfgang Meyer-Zaika und Herrn Dr. Zi-An Li danke ich für die Aufnahme von TEM-Bildern.



Frau Sabine Kiefer danke ich für die stetigen Hilfestellungen und Informationen zur Bedienung der großen bürokratischen Maschinerie.

Frau M. Sc. Kateryna Loza danke ich für die Aufnahmen von REM-Bildern, für ihre unbeschwerte Art, die freundliche Nachbarschaft in D29 und ihre große Toleranz in Sachen Musik.

Frau M. Sc. Svitlana Chernousova und Frau M. Sc. Diana Kozlova danke ich für die Durchführung der zellbiologischen Experimente.

Herrn M. Sc. Benjamin Schütze und Herrn Dipl.-Chem. Jens Helmlinger danke ich für die Korrektur der sicherlich interessantesten Seiten dieser Arbeit.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich dafür, dass eine freundliche Arbeitsatmosphäre im manchmal etwas düsteren Laboralltag hinter den heruntergeklappten Außenrolläden herrschte. Dabei gilt mein besonderer Dank Dr. Thomas Annen, Dr. Manuel Neumeier, Dr. Thorsten Peitsch und Dr. Alexander Peetsch für die gemütlichen Bierchen nach Feierabend und die Expertenrunden in Sachen Fußball und Musik.

Ich danke besonders B. Sc. Alexander Rostek, dem mit Abstand besten Hotelzimmergenossen egal ob in Madrid, Fulda, New York oder auch Gießen. Du bist zu einem wirklich guten Freund geworden und ich hoffe, dass es dabei bleibt.

Ich danke allen Musikern, deren Kunstwerke mir die letzten Jahre und vor allem die Schreibphase versüßt haben.

Ich danke besonders auch meinen Eltern und meinem Bruderherz, ihr seid die beste Familie der Welt!

Und last aber ganz bestimmt nicht least danke ich Raphaela. Du hast einen anderen Menschen aus mir gemacht.